

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Leite  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

# **Documentos 174**

## **Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite**

**IX Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 14/03/12**

**X Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 10/08/12**

**XI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 15/03/13**

**XII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 09/08/13**

**XIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 21/02/14**

**XIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 05/08/14**

**Editor Técnico**

*Carlos Renato Tavares de Castro*

Embrapa Gado de Leite  
Juiz de Fora, MG  
2014

**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Leite  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**

## **Documentos 174**

### **Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite:**

**IX Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 14/03/12**

**X Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 10/08/12**

**XI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 15/03/13**

**XII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 09/08/13**

**XIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 21/02/14**

**XIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa  
Gado de Leite - 05/08/14**

**Editor Técnico**

*Carlos Renato Tavares de Castro*

Embrapa Gado de Leite

Juiz de Fora, MG

2014

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Leite**

Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
36038-330 Juiz de Fora – MG  
Fone: (32) 3311-7405  
Fax: (32) 3311-7424  
Home page: <http://www.cnpagl.embrapa.br>  
E-mail: [cnpagl.sac@embrapa.br](mailto:cnpagl.sac@embrapa.br)

**Unidade responsável pelo conteúdo**

Embrapa Gado de Leite

**Comitê de Publicações da Unidade**

Presidente *Marcelo Henrique Otenio*

Secretária Executiva *Emili Barcellos Martins Santos*

*Membros Alessandro de Sá Guimarães, Carla Christine Lange, Carlos Renato Tavares de Castro, Deise Ferreira Xavier, Fabio Homero Diniz, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto de Sousa Sobrinho, João Cláudio do Carmo Panetto, José Alberto Bastos Portugal, Kennya Beatriz Siqueira, Marcia Cristina de Azevedo Prata, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa Silva, Mariana Magalhães Campos, Mirton José Frota Morenz*

Supervisão editorial *Carlos Renato Tavares de Castro*

Tratamento de ilustrações *Carlos Alberto Medeiros de Moura*

Editoração eletrônica *Carlos Alberto Medeiros de Moura, Leonardo Mariano Gravina Fonseca e Pedro Henrique Melquiades Carvalho*

**1ª edição**

1ª impressão (2014): 2.000

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Dados Internacionais de Catalogação na publicação (CIP)**

Embrapa Gado de Leite

---

Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite (9. : 2012 : Juiz de Fora, MG).

Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite: IX Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - 14/03/12; X Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - 10/08/12; XI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - 15/03/13; XII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - 09/08/13; XIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - 21/02/14; XIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite - 05/08/14 / Editor técnico, Carlos Renato Tavares de Castro. – Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2014.

472 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 174).

ISSN 1516-7453

1. Agropecuária. 2. Pesquisa. 3. Resultados. I. Castro, Carlos Renato Tavares de. II. Título. III Série.

CDD 630.72

# **Autores**

**Carlos Renato Tavares de Castro**

Engenheiro Agrônomo, D.Sc. – Embrapa Gado de Leite  
Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco  
36038-330 – Juiz de Fora, MG  
carlos.castro@embrapa.br





# Apresentação

A Iniciação Científica é o primeiro passo na carreira de um cientista, de um professor ou de um pesquisador.

Para desenvolver um país é necessário desenvolver pessoas: elevar o patamar de informação disponível e prover a população de conhecimentos básicos de ciência e tecnologia, porque esses conhecimentos são centrais hoje em dia. Além disso, é necessário estimular os jovens a se tornarem profissionais da ciência e da tecnologia, para avançarmos no conhecimento existente.

Assim, é preciso que desde os primeiros anos da educação formal os (as) estudantes sejam postos em contato com a cultura científica, ou seja, com a maneira científica de produzir conhecimento e com as principais atividades humanas que têm moldado o meio ambiente e a vida humana ao longo da história.

Acima de tudo, é preciso permitir que sejam criativos e inovadores. E capazes de sonhar! Esses são os principais ingredientes da ciência.

A Embrapa Gado de Leite quando recebe jovens graduandos para realizarem sua iniciação científica está praticando esta máxima, vamos formar o futuro do nosso país, com visão crítica e possibilidade de atuação em ciência para o foco da agropecuária.

*Paulo do Carmo Martins*  
Chefe-geral da Embrapa Gado de Leite

# Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite



## IX Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

### Trabalhos:

#### 1. Comparação entre o setor lácteo brasileiro e britânico

Autores: Bruna Rodrigues Nascimento, Kennya Beatriz Siqueira, Daniel Auad Gama

#### 2. Evolução de preços dos principais insumos que compõem o ICPL Leite/Embrapa no período de maio de 2006 a janeiro de 2012

Autores: Carine Leite Péres, Alziro Vasconcelos Carneiro, Paulo do Carmo Martins

#### 3. Desempenho Financeiro de Propriedades Leiteiras

Autores: Paula Bottoni de Araújo, Bruna Gontijo, Tammy Senra, Paulo do Carmo Martins, Alziro Vasconcelos Carneiro

#### 4. Estruturação de banco de dados para tomada de decisão em programas de controle e prevenção da mastite (resultados parciais)

Autores: Raíssa Salomão Ozório, Andrea Freguglia Bruno, Samuel Miguel Hylario, Juliana de Lima Brandão Guimaraes, Victor Muiños B. Lima, Mário Baptista L. Júnior<sup>5</sup>, Leandro Rubiale, Marcos Cicarini Hott, Márcio Roberto Silva, Guilherme N. Souza

#### 5. Frequências Genotípicas e Alélicas do Gene da Kappa-Caseína

Autores: Willian Pascoa Pereira<sup>1</sup>, Isabela Gomes Barreto da Motta, Isabela Fonseca, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos, Wagner Antonio Arbex, Ítala Iara Medeiros de Araújo, Marcos Vinícius G. B. Silva, Marta Fonseca Martins

#### 6. Comparação entre cenários futuros de distribuição geográfica do *Sipha flava* no Brasil com base no Terceiro e no Quarto Relatórios de Avaliação do IPCC

Autores: Letícia d'Agosto Miguel Fonseca, Marcos Cicarini Hott, Alexander Machado Auad, Maryá Cristina Rabelo, Thiago Gerheim Andrade, Emília Hamada

#### 7. Dinâmica da cobertura florestal no município de Eldorado do Carajás/PA nas últimas décadas

Autores: Thiago Gerheim de Andrade, Letícia d'Agosto Miguel Fonseca, Maryá Cristina Rabelo, Marcos Cicarini Hott, Fábio Homero Diniz, Kasper Kok, Bas Arts

#### 8. Cenário de Áreas de Preservação Permanente: estudo de caso para a mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba

Autores: Maryá Cristina Rabelo, Marcos Cicarini Hott, Letícia d'Agosto Fonseca, Thiago Gerheim de Andrade

#### **9. A captação de leite fluido em 2011**

Autores: Daniel Auad Gama, Kennya Beatriz Siqueira, Bruna Rodrigues Nascimento

#### **10. Cenário de exportação e importação de lácteos do Brasil e do Mundo**

Autores: Maryá Cristina Rabelo, Kennya Beatriz Siqueira, Marcos Cicarini Hott, Letícia d'Agosto Fonseca, Daniel Auad Gama

#### **11. Análise espacial de indicadores de qualidade do leite**

Autores: Andrea Freguglia Bruno, Raíssa Salomão Ozório, Samuel Miguel Hylario, Marília Hauck da Encarnação, Gilvânia Lúcia Oliveira de Carvalho, Célia Regina Grego, Marcos Cicarini Hott, Márcio Roberto Silva, Guilherme Nunes de Souza

#### **12. Impacto do dióxido de carbono nos aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)**

Autores: Dayane Ribeiro dos Santos, Alexander Machado Auad, Marcy das Graças Fonseca, Tiago Teixeira Resende, Thiago Henrique dos Santos

#### **13. Tolerância diferencial de clones de capim-elefante ao alumínio tóxico**

Autores: Marlene Aparecida Cantarino; Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto Souza Sobrinho, Francisco José da Silva Léo, Juarez Campolina Machado, Fernando Teixeira Gomes, Alexandre Magno Brighenti; Anne Caroline Barbosa de Carvalho, Ricardo Ottoni da Silva; Leandro de Senna Monai; Taís Helena Silva de Oliveira.

#### **14. Armazenamento de pólen de *Brachiaria* para realização de cruzamentos controlados**

Autores: Rafaela Venançoni Matoso, Anna Carolina Pereira Staico, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto Souza Sobrinho

#### **15. Prospeção de microrganismos celulolíticos e/ou xilanolíticos em sistema de manejo de dejetos da pecuária leiteira**

Autores: Camila Branda dos Reis, Renata da Costa Barros Silva, Ana Luíza de Moura Carmo, Lorena Evangelista Fernandes, Junior César Fernandes; Marlice Teixeira Ribeiro; Jailton da Costa Carneiro; Marcelo Henrique Otenio

#### **16. Influência da cobertura vegetal na qualidade da água no entorno do Parque Estadual do Ibitipoca e do Parque Estadual do Papagaio em Minas Gerais**

Autores: Gabriele Medeiros dos Santos, Marcelo Henrique Otenio, Marcos Ciccarini Hott, Maria Leonor Ribeiro Casimiro Lopes Assad

#### **17. Prospeção de bactérias xilanolíticas e celulolíticas no conteúdo ruminal de vacas secas**

Autores: Renata da Costa Barros Silva, Lorena Evangelista Fernandes, Camila Branda dos Reis, Ana Luíza de Moura Carmo, Ludmila de Souza da Caputo Valente, Mayara Souza Breder Valente, Junior César Fernandes, Marlice Teixeira Ribeiro, Jailton da Costa Carneiro, Cláudio Gallupo Diniz, Marcelo Henrique Otenio

**18. Avaliação da produção de biogás a partir de dejetos da pecuária leiteira em biodigestor escala laboratorial**

Autores: Samuel de Oliveira Fortunato, Juliana Alves Resende, Tamara Lopes Rocha de Oliveira, Ernando Ferreira Motta, Júnior César Fernandes; Marlice Teixeira Ribeiro, Jailton da Costa Carneiro, Marcelo Henrique Otenio

**19. Avaliação quantitativa de grupos bacterianos representativos em sistemas de produção de biogás a partir da digestão anaeróbica de dejetos da pecuária leiteira**

Autores: Tamara Lopes Rocha de Oliveira, Juliana Alves Resende, Samuel Fortunato, Jailton da Costa Carneiro, Marlice Teixeira Ribeiro, Júnior César Fernandes, Vânia Lúcia da Silva, Cláudio G. Diniz, Marcelo Henrique Otenio

**20. Teores de proteína bruta e fibra em detergente neutro da *Brachiaria decumbens* em monocultivo e em sistema silvipastoril submetida ou não à fertilização**

Autores: Bruno da Costa Domith, Domingos Sávio Campos Paciullo, Clenardo Macedo Lopes, Daniele Pereira da Silva, Mirton José Frota Morenz, Carlos Augusto de Miranda Gomide, Carlos Renato Tavares de Castro

**21. Produção de leite em pastagem de capim-Marandu submetido ao período de descanso fixo ou conforme a interceptação luminosa pelo dossel forrageiro**

Autores: Emiliano Araújo Salgado, Carlos Augusto de Miranda Gomide, Albert José do Anjos, Vinícius Sacramento Pacheco, Domingos Sávio Campos Paciullo, Mirton José da Frota Morenz

**22. Avaliação da expressão de genes de estresse e apoptose em fibroblastos bovinos expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Azadirachta indica***

Autores: Natana Chaves Rabelo, Michele Munk Pereira, Sabine Wohlrres-Viana, Savana Giacomini Brito, Carolina Capobianco Romano Quintão, João Henrique Moreira Viana, Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**23. Efeitos da adição de coprodutos do biodiesel na fermentação ruminal *in vitro*, cinética de digestão e produção de metano**

Autores: Paula Pereira Ribeiro de Moura, Larissa Gomes dos Reis, Ellen Almeida Moreira, Carollina Banni Alevato, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos, Fernando Cesar Ferraz Lopes, Heloisa Carneiro, Alexandre Vieira Chaves, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

**24. Degradabilidade *in situ* da proteína bruta de coprodutos do biodiesel**

Autores: Larissa Gomes dos Reis, Paula Pereira Ribeiro de Moura, Ellen Almeida Moreira, Carollina Banni Alevato, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos, Fernando Cesar Ferraz Lopes, Heloisa Carneiro, Alexandre Vieira Chaves, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

**25. Tolerância diferencial de clones de capim elefante ao alumínio tóxico**

Autores: Marlene Aparecida Cantarino; Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto Souza Sobrinho, Francisco José da Silva Lédo, Juarez Campolino Machado, Fernando Teixeira Gomes, Alexandre Magno Brighenti; Anne Caroline Barbosa de Carvalho, Ricardo Ottoni da Silva; Leandro de Senna Monaia; Taís Helena Silva de Oliveira

**26. Isolamento de fungos anaeróbios do rúmen com potencial para aplicação biotecnológica**

Autores: Caputo, L.S.; Valente M.S.B.; Fernandes L.E.; Silva R.C.B.; Carneiro, J.C.; Otenio, M.H.; Ribeiro M.T.

**27. Estabilidade aeróbica de silagem de soja com diferentes concentrações de glicerina**

Autores: Ana Luíza de Moura Carmo, Camila Branda dos Reis, Renata da Costa Barros Silva, Lorena Evangelista Fernandes, Junior César Fernandes, Marlice Teixeira Ribeiro, Marcelo Henrique Otenio, Jailton da Costa Carneiro

# **Comparação entre o setor lácteo brasileiro e britânico**

## **Comparison between the Brazilian dairy sector and UK dairy sector**

Bruna Rodrigues Nascimento<sup>1</sup>, Kennya Beatriz Siqueira<sup>2</sup>, Daniel Auad Gama<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Economia – UFJF. Bolsista do CNPq. Email: e-ncal2@cnpqgl.embrapa.br

<sup>2</sup> Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite. Email: kennya@cnpqgl.embrapa.br

<sup>3</sup> Estudante de Economia – UFJF. Bolsista do CNPq. Email: e-ncal@cnpqgl.embrapa.br

**Resumo:** A trajetória crescente da economia brasileira fez com que ela alcançasse o sexto lugar entre as principais economias mundiais, ultrapassando o Reino Unido. Diante disso, este artigo tem como objetivo comparar as economias britânica e brasileira entre 2000 e 2011, utilizando como base fontes secundárias. No setor lácteo, que é o principal objetivo de discussão desse artigo, o Brasil apresenta maior produção, porém, está aquém em outras variáveis como consumo, importação e exportação, apresentando uma participação pouco significativa no comércio internacional.

**Palavras-chave:** Brasil, economia, mercado lácteo, PIB, Reino Unido.

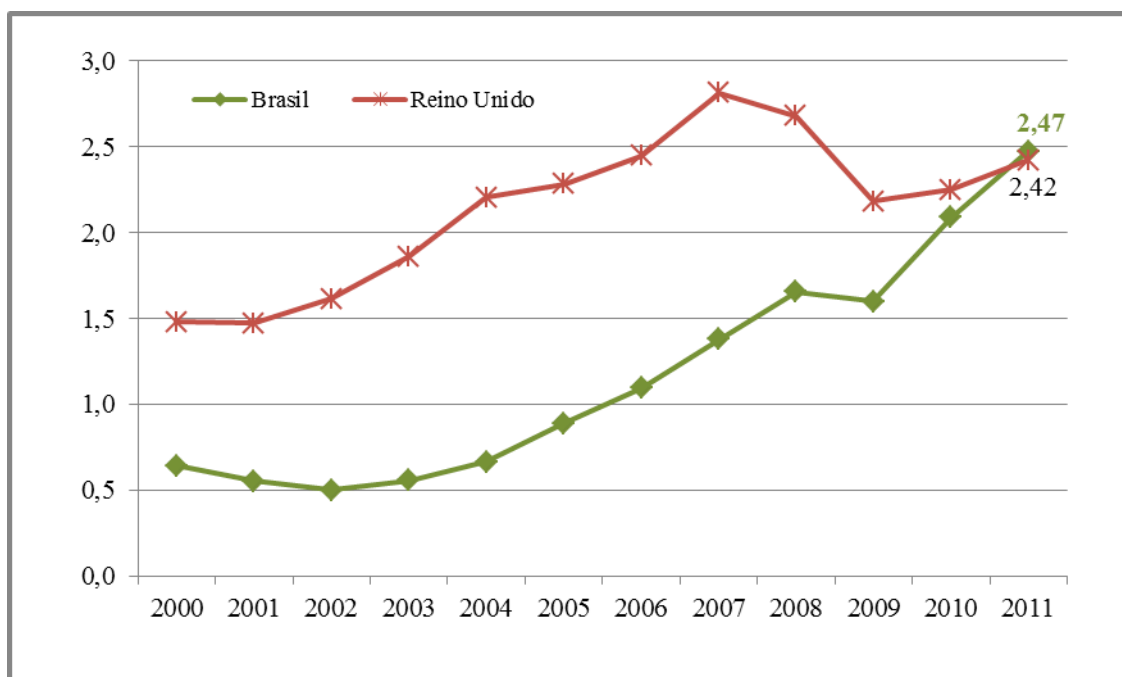
**Abstract:** With an upward trend of the Brazilian economy it reached the sixth place among the major economies, surpassing the United Kingdom. So, this article aims to compare the British and Brazilian economies between 2000 and 2011, using secondary sources as a basis. In the dairy sector, which is the main purpose of this paper, Brazil has advantage in milk production; however, in the other variables as consumption, import and export Brazil is below UK, with a minor participation in international trade.

**Keywords:** Brazil, economy, dairy market, GDP, United Kingdom.

### **Introdução**

A crise do sistema financeiro internacional em 2008, aliada ao pessimismo que assola a zona do euro nos últimos anos, tem provocado mudanças no cenário econômico mundial. Mais especificamente, o forte crescimento dos países emergentes tem elevado a participação destes na economia global. Segundo o FMI (2011), as economias em desenvolvimento devem apresentar crescimento de 6,4% do Produto Interno Bruto (PIB) em 2011, em contraposição ao baixo crescimento estimado para as economias avançadas, de 1,61%. Além disso, previa-se que o Brasil encerraria o ano de 2011 como a sexta maior economia do mundo, ultrapassando o Reino Unido.

Segundo o IBGE (2012), o PIB brasileiro ficou em US\$ 2,47 trilhões em 2011, crescendo 2,7% em relação a 2010. Com isso, o Brasil confirmou a previsão feita pelo FMI, tornando-se a sexta maior economia do mundo. O crescimento do Reino Unido ficou em 0,8%, fechando 2011 com um PIB de US\$ 2,42 trilhões (CEBR, 2012). A Figura 1 ilustra a evolução das economias brasileira e britânica.



**Figura 1.** Evolução do PIB para o Brasil e Reino Unido, em trilhões de dólares correntes.  
**Fonte:** Adaptado de IMF e IBGE (2012).

Apesar de o Brasil ter ultrapassado o Reino Unido em termos de PIB, outros indicadores mostram que esse número ainda representa pouco em termos de qualidade de vida e desenvolvimento econômico. Quando analisamos o PIB *per capita* desses dois países, constatamos que o Brasil se encontra muito longe de proporcionar a sua população um padrão de renda parecido com o britânico, que chega a ser três vezes maior que o brasileiro. No *ranking* mundial do Índice de Desenvolvimento Humano (IDH), o Brasil se encontra na 84ª posição, enquanto o Reino Unido fica em 26ª (CEBR, 2012).

Um dos fatores que contribuíram para o crescimento do PIB brasileiro foi o setor agropecuário, com expansão de 3,9% em 2011, chegando ao valor corrente de R\$ 192,7 bilhões (IBGE, 2012). Só no quarto trimestre o crescimento foi de 0,9% sobre o período anterior. Quando a comparação se dá ao quarto trimestre de 2010, esse número aumenta consideravelmente, chegando a 8,9% de expansão, ante 1,4% do PIB. Esse crescimento se deve ao aumento da produção e ganhos com produtividade de várias culturas importantes. O leite é um dos produtos brasileiros que tem apresentado crescimento contínuo de produção e valor da produção ao longo dos anos, contribuindo assim, para um desempenho positivo do PIB do País. Assim, torna-se oportuno comparar a atividade leiteira no Brasil e no Reino Unido, como forma de identificar se neste setor o Brasil também tem evoluído e se equiparado aos países desenvolvidos. Sendo assim, o objetivo geral deste trabalho é comparar o setor lácteo de Brasil e Reino Unido.

## Material e Métodos

Para realizar a comparação do setor lácteo brasileiro com o do Reino Unido, foram consideradas as seguintes variáveis: rebanho, produção, produtividade, consumo, exportação e importação de lácteos. Para coletar tais variáveis, foram utilizadas fontes de dados secundárias, como IFCN, Cepea, Comtrade, etc. A partir desses dados, foi feita uma análise das economias brasileira e britânica, com foco no setor lácteo.

## Resultados e Discussão

No setor lácteo, Brasil e Reino Unido estão entre os dez maiores produtores de leite de vaca. Com uma produção de 30,8 milhões de toneladas em 2010, o Brasil ocupou



a quinta posição no *ranking*, enquanto o Reino Unido ocupou a décima posição, com 13,8 milhões de toneladas. Entre 2006 e 2010, a produção brasileira cresceu a uma taxa de 4,9% ao ano, ao contrário da produção britânica que decresceu a uma taxa de 0,8%. Apesar de ter um volume de produção muito superior ao do Reino Unido, o Brasil convive com uma taxa de produtividade muito inferior, 1,3 t/vaca/ano, contra 7,5 do Reino Unido (HEMME et al., 2011). A Tabela 1 a seguir mostra a produção nos dois países, assim como o tamanho do rebanho e a produção média.

**Tabela 1.** Produção (milhões de toneladas), rebanho (em milhares de cabeças) e produtividade (t/vaca/ano) no Brasil e Reino Unido.

Ano	Brasil			Reino Unido		
	Produção	Rebanho	Produtividade	Produção	Rebanho	Produtividade
2000	19,8	17.885	1,1	14,51	2.336	6,2
2002	21,68	18.793	1,2	14,65	2.227	6,6
2004	23,51	20.023	1,2	14,37	2.129	6,8
2006	25,44	20.943	1,3	14,26	2.066	6,9
2008	27,63	21.585	1,3	13,75	1.909	7,2
2010	30,76	22.999	1,3	13,81	1.847	7,5

Fonte: Hemme et al. (2011).

Com relação ao número de estabelecimentos que produzem leite, o Brasil possuía mais de 1,16 milhões de fazendas em 2010, número muito superior ao encontrado para o Reino Unido, com apenas 16 mil estabelecimentos. De acordo com Hemme et al. (2011), em 2010, o número de vacas por fazenda no Brasil era, em média, 20 enquanto que para o Reino Unido este número era 118.

O consumo de lácteos nos dois países apresentou um comportamento semelhante ao encontrado para a produção. Enquanto o consumo *per capita* cresce a uma taxa de 2,2% ao ano no Brasil, no Reino Unido o consumo tem recuado 0,7% ao ano, entre 2005 e 2009. Em compensação, o consumo doméstico britânico é superior ao recomendado pela FAO, chegando a 263 Kg/hab/ano, e consequentemente, superior ao consumo no Brasil, de apenas 146 Kg/hab (HEMME et al., 2010).

No comércio internacional de lácteos, segundo o Comtrade (2012), o Reino Unido exportou o equivalente a 1,77 bilhões de dólares em 2011, apresentando aumento de 24,3% se comparado com 2010, quando sua exportação chegou a 1,43 bilhões de dólares. A importação também vem aumentando, porém, em proporções menores. Em 2011, a importação de produtos lácteos do Reino Unido ficou em 3,56 bilhões de dólares, número 7,5% maior que o de 2010. Entre os principais parceiros do Reino Unido no comércio internacional de lácteos estão os países europeus, devido à proximidade entre eles e à livre circulação de mercadorias.

Ao contrário do Reino Unido, o Brasil apresenta uma participação mais modesta no comércio internacional. De acordo com o MDIC (2012), o País exportou aproximadamente 97 milhões de dólares em produtos lácteos em 2011, o que representa uma diminuição de 26% se comparado com 2010. Com relação às importações, o Brasil importou em torno de 605 milhões de dólares em 2011, que representa 85% a mais do que o importado no ano anterior.

## Conclusões

O fato de o Brasil ter encerrado o ano de 2011 como a sexta maior economia mundial é resultado do bom desempenho econômico do País nos últimos anos. Porém, vale ressaltar a diferença entre desempenho e desenvolvimento econômico. O Brasil ainda apresenta baixa renda *per capita* e índices sociais muito aquém de países desenvolvidos. No setor lácteo, apesar da produção brasileira ter apresentado um crescimento muito superior ao do Reino Unido, entre 2006 e 2010, a produtividade no Brasil é bastante inferior. Já os dados de consumo *per capita* refletem, em certa medida, a diferença do padrão de vida

entre os dois países. No contexto do comércio internacional de lácteos, o Reino Unido se mostrou bem mais participativo, tanto nas exportações como nas importações.

### **Agradecimento**

À Fapemig

### **Literatura Citada**

CEBR – Centro Para a Pesquisa Econômica e de Negócios. Disponível em: <<http://cebr.com/>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

CILEITE – Centro de Inteligência do Leite. Disponível em: <<http://cileite.com.br/>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

COMTRADE. Commodity Trade Division. – United Nations Commodity Trade Statistics Database. Disponível em: <<http://comtrade.un.org/>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponível em: <<http://fao.org>>. Acesso em: 02 mar. 2012.

FMI – Fundo Monetário Internacional. Disponível em: <<http://imf.org/>>. Acesso em: 06 mar. 2012.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Disponível em: <<http://ibge.gov.br/>>. Acesso em: 06 mar. 2012.

HEMME, T. et al. **IFCN Dairy Report 2010**: for a better understanding of milk production world-wide. Kiel: International Farm Comparison Network, Dairy Research Center, 2010.

HEMME, T. et al. **IFCN Dairy Report 2011**: for a better understanding of milk production world-wide. Kiel: International Farm Comparison Network, Dairy Research Center, 2011.

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: <<http://mdic.gov.br/>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

# **Evolução de preços dos principais insumos que compõem o ICPL Leite/Embrapa no período de maio de 2006 a janeiro de 2012**

## **Evolution of prices of key inputs that make up the ICPL Leite/Embrapa from May 2006 to January 2012**

Carine Leite Péres<sup>1</sup>, Alziro Vasconcelos Carneiro<sup>2</sup>, Paulo do Carmo Martins<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista da Fapemig, estudante de economia da Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco, Juiz de Fora – MG, Brasil. Tel: 3311-6497. alziro.carneiro@embrapa.br, paulo.martins@embrapa.br.

**Resumo:** O objetivo deste estudo é apresentar e discutir o procedimento adotado pela Embrapa Gado de Leite para calcular o Índice de Custo de Produção de Leite (ICPL Leite/Embrapa) e acompanhar a evolução do índice e dos grupos que o compõem. A metodologia utilizada para o cálculo do ICPL Leite/Embrapa é conhecida como Índice de Preços de Laspeyres. A estrutura de ponderação utilizada foi levantada junto a trinta fazendas em Minas Gerais. Os dados são relativos ao período de maio de 2006 a janeiro de 2012, tendo como mês base, abril/2006. Os grupos de insumos que mais pesaram na ponderação para a obtenção do índice de custo de produção do leite foram: Concentrado, Produção e compra de volumosos e Mão de obra. O grupo Concentrado apresentou alta de 90,2% no período considerado, ante uma alta de 81,9% do índice de custo de produção do leite. O grupo Mão de obra apresentou uma alta de 97,4%. As maiores altas ocorreram no início dos anos, em consequência do aumento do salário mínimo, refletindo a política governamental de promover aumento do salário mínimo com índices acima da inflação. Com peso de 21,03% no cálculo do ICPL Leite/Embrapa, o grupo Produção e compra de volumosos foi menor que o Índice de Custo de Produção do Leite, apresentando alta de 69,9% no período considerado.

**Palavras-chave:** custo de produção, ICPL Leite/Embrapa, insumos.

**Abstract:** The objective of this study is to present and discuss the procedure adopted by Embrapa Dairy Cattle to calculate Cost Index Milk Production (ICPL Leite/Embrapa) and follow the evolution of the index and its constituent groups. The methodology used to calculate the ICPL Leite/Embrapa is known as the Laspeyre's Price Index. The weighting structure used was raised from thirty farms in Minas Gerais. Data are for the period May 2006 to January 2012, with the base month, April/2006. Groups weighed more inputs for obtaining weighting in the index of cost of milk production were: Concentrate Production and sale of bulky and Labor. The group had a high concentrate of 90.2% during the period, down from a high of 81.9% the rate of cost of milk production. The labour group had a high of 97.4%. The largest increases occurred in the early years as a result of the minimum wage increase, reflecting the government policy of promoting minimum wage increase with rates above inflation. With brunt of 21.03% in the calculation of ICPL Leite/Embrapa the group Production and sale of forage was lower than the Index of Production Cost of Milk, showing an increase of 69.9% over the period.

**Keywords:** cost of production, ICPL Leite/Embrapa, inputs.

### **Introdução**

O custo de produção constitui instrumento de extrema importância na tomada de decisão e gestão profissional de qualquer atividade econômica. No caso específico da pecuária leiteira bovina, diante da grande heterogeneidade dos sistemas de produção praticados, torna-se bastante difícil apurar e divulgar estruturas de custos com

características de representatividade universal, quando se pretende auxiliar na tomada de decisão e prover gestão eficaz de empresas de produção de leite.

Além disso, o custo de produção para as empresas constitui elemento estratégico na organização e definição de políticas comerciais. Neste particular, os custos são de propriedade privada em que as empresas podem mostrar resistência quanto a torná-las de domínio público, principalmente, na pós-desregulamentação do mercado de leite, a partir de 1991, quando o preço em nível de produtor passou a ser estabelecido pelas forças do mercado.

No passado, um procedimento bastante utilizado foi o levantamento de custos em empresas de produção de leite com aplicação de questionários e obtenção de estrutura de custo médio. Tal procedimento, além de oneroso oferecia apenas um retrato da situação, mostrando ser de pouca utilidade enquanto instrumento auxiliar de gestão da exploração da atividade leiteira, em nível de unidade produtiva. Também foi bastante usual o sistema de acompanhamento das empresas de produção de leite para registrar, mensalmente, dados zootécnicos e de custos. Além dos resultados gerados serem semelhantes àqueles obtidos no procedimento anterior, este método requer gastos mais elevados e emprego de grande contingente de técnicos da rede de serviços de extensão rural. Os dados mensais de custos eram somados para se obter o valor anual, e posterior cálculo da média mensal.

Diante dos problemas identificados, a Embrapa Gado de Leite desenvolveu procedimentos para calcular índices de custo de produção de leite com periodicidade mensal. Nesta modalidade de pesquisa, os índices apurados medem a variação mensal dos preços de uma determinada cesta de insumos e serviços empregados no processo produtivo. Trata-se de um índice semelhante ao calculado para medir a variação mensal do custo de vida de uma família típica.

O presente estudo tem como objetivos apresentar e discutir: (a) o procedimento adotado pela Embrapa Gado de Leite para calcular o Índice de Custo de Produção de Leite (ICPL Leite/Embrapa), e (b) a evolução do Índice e dos grupos que o compõem no período de maio/2006 a janeiro/2012.

## Material e Métodos

O método utilizado para obter o ICPL Leite/Embrapa foi aquele conhecido como Índice de Laspeyres (HOFFMANN et. al., 1976), que adota uma base de ponderação fixa (valores do ano base) e considera a evolução de preços num período, computado da seguinte forma:

$$I_L = \frac{\sum P_t Q_0}{\sum P_0 Q_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde,  $P_0$  = preços dos diferentes serviços e insumos no ano base,  $Q_0$  = quantidade desses serviços e insumos no ano base e  $P_t$  = preço dos serviços e insumos no mês t.

A estrutura de ponderação utilizada para o cálculo do ICPL Leite/Embrapa foi obtida a partir de informações coletadas junto a trinta fazendas produtoras de leite localizadas no estado de Minas Gerais. Os preços de insumos e serviços utilizados na produção de leite foram levantados em pesquisas mensais realizadas junto a cooperativas e empresas localizadas em Minas Gerais, que após passar por processo de crítica e conferência são armazenados em banco de dados especificamente desenvolvido para tal finalidade. Os coeficientes técnicos, que dão origem à estrutura de ponderação correspondem aos levantados apenas no setor de produção de leite, excluindo-se o setor de produção de fêmeas para reposição de vacas, mais especificamente a cria e recria de fêmeas. O procedimento para segmentação do sistema global de produção de leite, para isolar o setor de produção de leite é discutido em Yamaguchi et.al. (2002, 2007 e 2008). Os dados são relativos ao período de maio de 2006 a janeiro de 2012.

## Resultados e Discussão

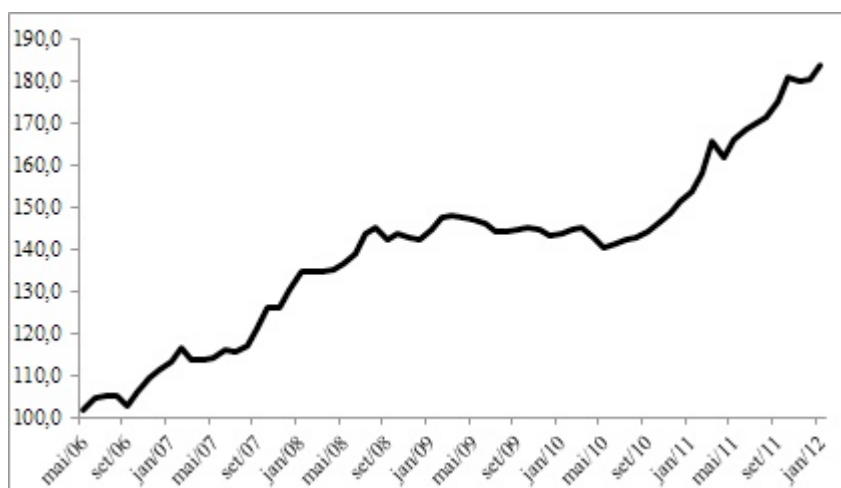
A composição da estrutura de ponderação adotada, por grupos, é apresentada na Tabela 1. Os grupos que compõem a alimentação do rebanho são os que participam com maiores pesos na estrutura de custo, justificado por se tratar de um sistema de produção que adota maior nível tecnológico.

Na Figura 1 procurou-se ilustrar a evolução do ICPLeite/Embrapa (em valores nominais) no período de maio/2006 a janeiro/2012 (69 meses), tendo como mês base abril/2006, igual a 100. Houve evolução de 81,9% no período considerado. De maneira geral pode-se identificar três momentos distintos na evolução deste índice. O primeiro momento se estende de maio/2006 a julho/2008, em que na maioria dos meses foi possível observar alta acentuada, com ligeira redução em apenas dois meses (agosto/2006 e março/2007). No segundo momento, de agosto/2008 a abril/2010 o ICPLeite/Embrapa manteve uma tendência de estabilidade, com alternância de situações favorável/desfavorável para o produtor de leite, embora sem oscilações bruscas. No terceiro momento, que vai de abril/2010 a janeiro/2012, novamente inicia-se um período de alta que tornou-se mais acentuado a partir de outubro/2010.

**Tabela 1.** Composição da estrutura de ponderação por grupos - Índice de custo de produção de leite da Embrapa Gado Leite (ICPLeite/Embrapa).

Grupos	Pesos
Mão de obra	8,49
Produção e compra de volumosos	21,03
Concentrado	57,54
Sal mineral	2,24
Sanidade	4,40
Qualidade do leite	1,21
Reprodução	1,50
Energia e combustível	3,57
<b>Soma</b>	<b>100,00</b>

Fonte: Embrapa Gado de leite



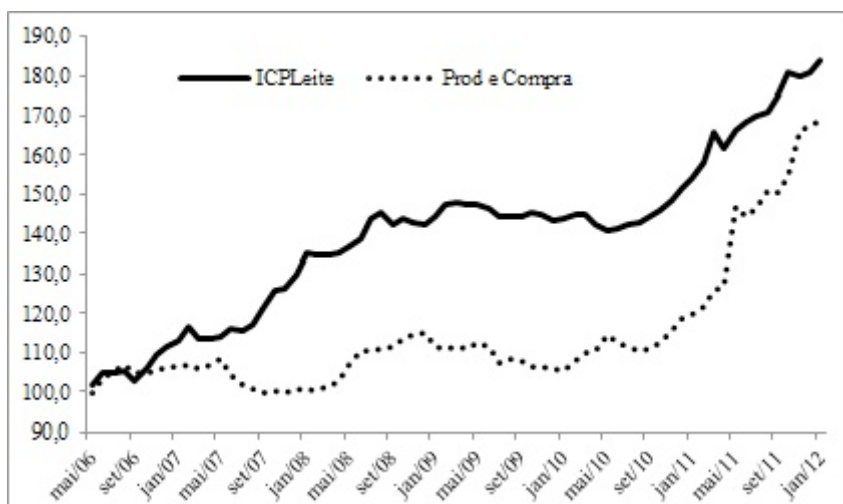
**Figura 1.** Evolução do ICPLeite/Embrapa no período de maio de 2006 a janeiro de 2012

Fonte: Embrapa Gado de Leite

Nota-se que em 2006, 2007, 2010 e 2011, a aceleração dos custos foi expressiva no segundo semestre, impulsionada pela valorização dos componentes da alimentação concentrada no mercado mundial. O programa de biocombustíveis nos Estados Unidos, que tem no milho a principal matéria prima para a produção de etanol,

provocou aumento nos preços dos principais insumos utilizados na ração animal, devido à competição dessas lavouras pelo uso das terras nos Estados Unidos.

A seguir será apresentado o comportamento dos preços dos insumos que compõem os três principais grupos utilizados no cálculo do ICPL Leite/Embrapa, no período de maio/2006 a janeiro/2012. O primeiro grupo de insumos estudado será Produção e compra de volumosos, cuja cesta de insumos é composta por corretivos e fertilizantes, semente de capim e de milho, mudas de cana de açúcar e capim elefante, enfim, insumos utilizados para produção de silagem de milho e manutenção de pastagens e capineiras.

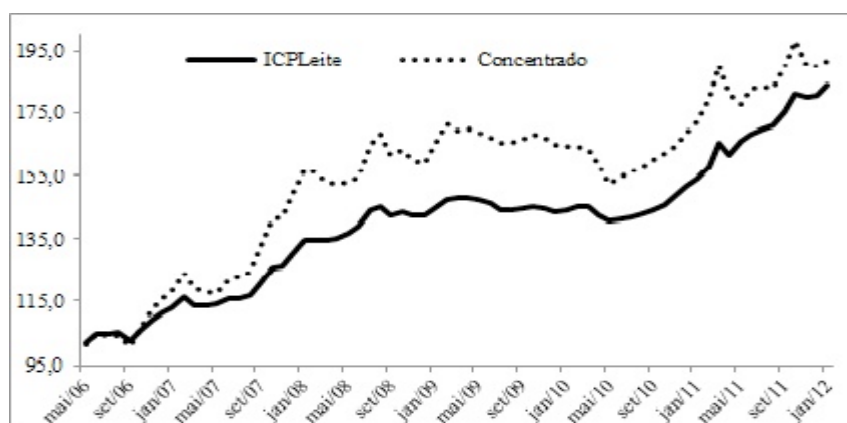


**Figura 2.** Evolução de preços dos insumos que compõem o grupo Produção e compra de volumosos e do ICPL Leite/Embrapa, no período de maio de 2006 a janeiro de 2012.

Fonte: Embrapa Gado de leite

Com peso de 21,03% no cálculo do ICPL Leite/Embrapa, os insumos que compõem este grupo apresentaram alta de 69,6% no período considerado, ante uma alta de 81,9% do índice de custo de produção do leite. Este índice oscilou ao longo do período desta análise, porém sempre se mantendo abaixo do ICPL Leite/Embrapa.

O segundo grupo de insumos estudado foi Concentrado. A cesta de insumos que compõe este grupo é composta pelos ingredientes utilizados no preparo de ração para vacas leiteiras, tais como milho, farelos de soja, trigo e algodão, etc. A Figura 3 ilustra a evolução deste insumo comparado com o ICPL Leite/Embrapa.



**Figura 3.** Evolução de preços dos insumos que compõem o grupo Concentrado e do ICPL Leite/Embrapa, no período de maio de 2006 a janeiro de 2012.

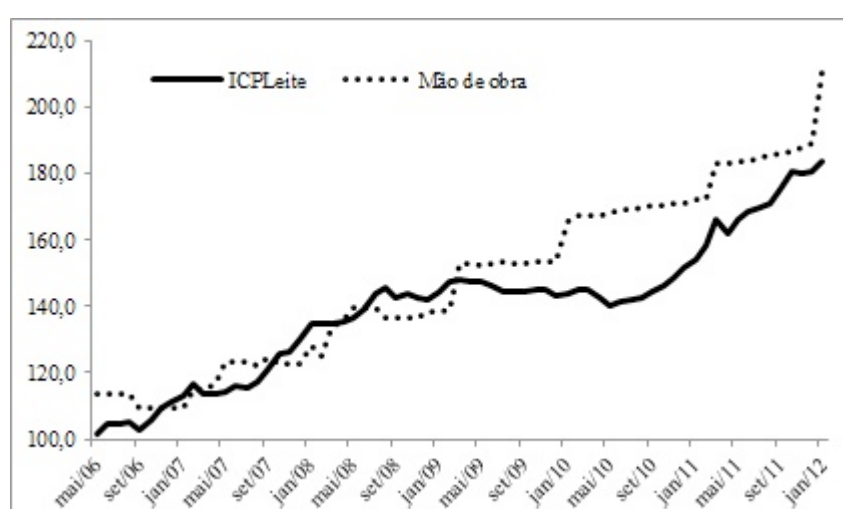
Fonte: Embrapa Gado de leite

Este grupo de insumos apresentou alta de 90,2% no período considerado, ante 81,9% do Índice de Custo de Produção do Leite. Isto pode ser explicado pela alta participação deste grupo de insumos na formação do índice. Dentre os insumos que

compõem este grupo, o milho foi o que apresentou maior alta no período. No período deste estudo, os insumos que compõem este grupo foram fortemente influenciados pela valorização de preços no mercado mundial. Especificamente no início da série houve o lançamento do programa de biocombustíveis nos Estados Unidos, tendo o milho como a principal matéria-prima para a produção de etanol. Isso provocou diretamente um aumento nos preços do milho e indiretamente também da soja, devido à competição dessas lavouras pelo uso das terras nos Estados Unidos.

A Figura 4 ilustra a evolução do ICPL Leite/Embrapa e dos insumos que compõem o grupo Mão de obra, que apresentou uma alta de 97,4% no período considerado.

Nota-se que até 2008 a variação do insumo mão de obra permaneceu colada no ICPL Leite, variando ora para mais, ora para menos. A partir de janeiro/2009, a variação do custo da mão de obra descolou definitivamente do ICPL Leite/Embrapa, como reflexo da política governamental de promover aumento do salário mínimo com índices acima da inflação. Observa-se também que as maiores altas ocorrem no começo do ano, em consequência do aumento do salário mínimo.



**Figura 4.** Evolução de preços dos insumos que compõem o grupo Mão de obra e do ICPL Leite/Embrapa, no período de maio de 2006 a janeiro de 2012.

Fonte: Embrapa Gado de leite

## Conclusões

O ICPL Leite/Embrapa tem contribuído para monitorar os custos de produção. Ao longo do período analisado, maio/2006 a janeiro/2012, o custo de manutenção de uma empresa de produção de leite do Estado de Minas Gerais subiu 81,9% em termos nominais. As principais altas foram registradas nos grupos de Concentrado, Mão de obra e Produção e compra de volumosos. Os insumos que compõem os grupos Mão de obra e Concentrado tiveram alta acima do ICPL Leite/Embrapa, de 97,4% e 90,2%, respectivamente. Neste mesmo período os preços que compõem o grupo de insumos Produção e compra de volumosos de leite subiram 69,6%. Por fim, vale destacar que essas informações podem ser interessantes aos formuladores de política pública e aos laticínios para a elaboração de propostas de garantia de renda aos produtores de leite, evitando sua saída da atividade.

## Agradecimentos

À Fapemig pelo apoio nesta pesquisa.

### **Literatura Citada**

HOFFMANN, R.; SERRANO, O.; NEVES, E. M.; THAME, A. C. de M.; ENGLER, J. J. de C. **Administração da empresa agrícola**. São Paulo, SP: Pioneira, 1976. 323 p.

YAMAGUCHI, L. C. T.; MARTINS, P. do C.; CARNEIRO, A. V.; MACHADO, A. D. C. **Custo de produção de leite**: abrindo a caixa preta. Curvelo, MG: Cooperativa Agropecuária de Curvelo Ltda./Embrapa Gado de Leite, 2002. 72 p.

YAMAGUCHI, L. C. T.; CARNEIRO, A. V.; MARTINS, P. do C. **Sistema para análise de custos da atividade leiteira segmentados em setores de produção e serviços**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2007. 26 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 123).

YAMAGUCHI, L. C. T.; MARTINS, P. do C.; CARNEIRO, A. V.; ZOCCAL, R.; CARVALHO, G.; FORTES, L. R. L. S.; OLIVEIRA, A. F. de. Índice de custo de produção de leite da Embrapa Gado de Leite. **Panorama do leite**, v. 2, n. 21, agosto de 2008. Disponível em < <http://www.cileite.com.br/panorama/edicao21.html>>. Acesso em: 03 de fev. 2012.



# Desempenho Financeiro de Propriedades Leiteiras

## Financial Performance of Dairy Properties

Paula Bottoni de Araújo<sup>2</sup>, Bruna Gontijo<sup>2</sup>, Tammy Senra<sup>2</sup>, Paulo do Carmo Martins<sup>1</sup>, Alziro Vasconcelos Carneiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite;

<sup>2</sup>Estagiários

**Resumo:** Aproximadamente 1,4 milhão das propriedades no Brasil se dedicam à atividade primária, gerando emprego e renda de modo descentralizado. Mesmo com mudanças onde as propriedades leiteiras buscaram internalizar tecnologias no processo produtivo, viu-se pouca transformação na implementação de tecnologias de gestão. Ainda é grande o número de propriedades que não promovem controles sobre situações que impactam o desempenho financeiro das propriedades. O produtor toma decisão sobre o futuro com base em informações do passado. Por isso o objetivo desse trabalho é avaliar os conceitos de gestão financeira e contábeis (EBTIDA, margem de EBTIDA, ROI, GIRO DO ATIVO, EVA e Pontos de Equilíbrio) em 21 propriedades leiteiras, visando obter indicadores que permitam analisar o desempenho mensal. Em média 23% das propriedades obtiveram EBTIDA negativo e 30% tiveram resultados consideráveis, porém em sua maioria encontra-se em dificuldade. A aplicação da metodologia visa melhoria na obtenção de práticas de manejo e gestão, para atender à demanda no setor.

**Palavras-chave:** análise financeira, propriedades leiteiras, sistema de produção

**Abstract:** Approximately 1.4 million properties in Brazil are engaged in primary activity, generating jobs and income in a decentralized manner. Even with changes where dairy herds tried to internalize technologies in the production process, there was little change in the implementation of management technologies. There is a huge number of properties that do not promote controls on situations that impact the financial performance of properties. The producer makes the decision about the future based on past information. Therefore the aim of this study is to evaluate the concepts of financial management and accounting (EBTIDA, EBTIDA's margin, ROI, asset turnover, EVA e break even price) on 21 dairy farms in order to obtain indicators to analyze the monthly performance. On average 23% of properties have obtained negative EBITDA and 30% had significant results, but mostly of the properties are in trouble. The methodology aims to achieve improved management practices and management, to meet demand in the sector.

**Keywords:** dairy farms, financial analysis, production systems.

## Introdução

A atividade primária ocorre em aproximadamente 1,4 milhão de propriedades em todo o Brasil, de acordo com o Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2012). O PIB da agropecuária brasileira encerrou 2011 com alta de 3,9%, crescendo mais que o PIB nacional que foi de 2,7% (IBGE, 2012). Como está presente em todo o território nacional, esta atividade possibilita a geração de emprego e renda de modo descentralizado, em praticamente todos os municípios brasileiros.

Apesar da transformação ocorrida nas últimas duas décadas, em que as propriedades leiteiras buscaram internalizar tecnologias no processo produtivo, pouco se avançou na adoção de tecnologias de gestão. Ainda é grande o número de propriedades que não promovem controles sistemáticos sobre os eventos que impactam o desempenho financeiro das propriedades. Por outro lado, as metodologias disponíveis para aferição de desempenho, nem sempre consideram indicadores zootécnicos e indicadores econômicos, numa análise em conjunto. Finalmente, há um vazio metodológico que tornam frágeis todas as análises atuais, pois o produtor que adota anotações sistematizadas toma

decisões no presente considerando os fatos econômicos acumulados nos últimos doze meses. Portanto, os fatos mais recentes e de maior impacto no presente são minimizados, o que induz o produtor a tomar decisões de modo pouco seguro. Na prática, o produtor toma decisão sobre o futuro com base em informações do passado, e não presente.

O presente trabalho objetivou testar a aplicação de conceitos de gestão financeira e contábeis em propriedades leiteiras, visando obter indicadores que permitam analisar o desempenho mensal, considerando indicadores econômicos e zootécnicos selecionados.

## Material e Métodos

Foram selecionadas 21 propriedades por meio de amostragem não representativa. Os produtores participantes da pesquisa têm mais de 70% da renda da propriedade auferida com leite e estão localizados nos estados de Minas Gerais e Goiás. A coleta de dados se deu entre os meses de julho e dezembro de 2011, através de um relatório próprio. Os seis entrevistadores passaram por 40 horas de treinamento teórico e prático. Para aferição do desempenho financeiro e contábil foram apurados os seguintes indicadores:

- ☐ EBTIDA (*Earning Before Interests, Taxes, Depreciation and Amortization*) – Caixa gerado na propriedade no mês. É uma medida aproximada de lucro, sem descontar a depreciação de máquinas e benfeitorias e os juros de financiamento;
- ☐ MARGEM DE EBTIDA – Percentual do caixa em relação à receita da sua propriedade no mês;
- ☐ ROI – Retorno financeiro obtido no mês com todos os investimentos que se tem na propriedade.
- ☐ GIRO DO ATIVO – Indica a eficiência no uso de ativos. Índice obtido pela divisão da receita da propriedade sobre o total de ativos;
- ☐ EVA (*Economic Value Added*) – É o valor perdido na produção de leite neste mês, depois que todos os fatores de produção foram remunerados, ou seja, o capital empatado com terra, máquina, e também o pagamento da mão-de-obra, empréstimos e de todos os fornecedores;
- ☐ PONTOS DE EQUILÍBRIO: a) FINANCEIRO– Volume de leite que permite cobrir todas as despesas da produção; b) OPERACIONAL – Volume de leite que permite cobrir todas as despesas da produção e da depreciação de ativos; c) ECONÔMICO – Volume de leite que permite cobrir todas as despesas da produção, da depreciação de ativos e remunera os fatores de produção;
- ☐ Visando explicar os indicadores econômicos encontrados, também foram levantados indicadores zootécnicos, considerando: Estrutura do rebanho (percentuais de vaca em lactação em relação ao rebanho e vaca em lactação em relação ao total de vacas); Produção; Produtividade dos fatores (vaca, mão de obra e terra); Gastos com mão de obra em relação à receita e; Perda com morte de animais.

Como complementos das informações levantadas, são considerados bonificações de qualidade, representadas por Contagem bacteriana total - CBT, Contagem de células somáticas - CCS, Matéria Gorda e Proteína. Os resultados são apresentados aos produtores em apenas uma folha de papel A4.

## Resultados e Discussão

Das 21 propriedades estudadas, cinco apresentaram EBTIDA negativo. Estas propriedades estão insolventes e devem parar a atividade produtiva se o resultado persistir nos meses subsequentes. A Margem de EBTIDA entre as 21 propriedades variou cerca de 460% no mês de julho, 190% no mês de agosto, 160% no mês de setembro, 240% no mês de outubro, 140% no mês de novembro e 100% no mês de dezembro.

O ROI variou 3,90% no mês de julho, 1,12% no mês de agosto, 1,41% no mês de setembro, 2,17% em outubro, 1,69% em novembro e 1,42% em dezembro. Cinco propriedades apresentaram resultado acima de 0,5% em julho, sete em agosto e em

setembro, nove em outubro, também sete em novembro e dezembro. Já o Giro do Ativo foi 0,17 em julho, 0,19 em agosto, 0,18 em setembro, 0,19 em outubro, 0,18 em novembro e 0,19% em dezembro. O EVA apresentou média no período de – R\$3.394,77, indicando que, na média, os produtores estudados perderam patrimônio.

Em média, o ponto de equilíbrio financeiro foi de 390 litros/dia entre julho e dezembro, o ponto de equilíbrio operacional foi de 618 litros/dia e o ponto de equilíbrio econômico foi 745 litros/dia.

Para o cálculo dos indicadores econômicos e financeiros acima citados utilizou-se alguns também indicadores de eficiência técnica e de qualidade do leite, como mostra a Tabela 1. Estes dois grupos de indicadores, em última análise, são os que impactam os indicadores econômicos e financeiros. Estes indicadores também são importantes para localizar e conhecer dentre as propriedades quais são os procedimentos gerenciais de melhor resultado, ou seja quais trazem eficiência econômica.

**Tabela 1.** Indicadores zootécnicos e de qualidade médios obtidos na amostragem.

Variáveis	Valores						
	Meses	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
Vacas em Lactação/Rebanho (%)		32,68	32,05	32,27	30,98	33,26	30,30
Vacas em Lactação/Total (%)		76,53	74,22	77,70	75,92	74,81	75,47
Produção (litros/dia)		536	429	447	410	293	310
Produtividade Vaca (litros/dia)		13	14	14	15	14	14
Produtividade MObra (litros/dia)		271	342	233	267	297	281
Produtividade Terra (litros/dia)		7	8	7	5	5	6
Gastos Concentr/Receita Total (%)		35,38	36,19	43,80	32,25	42,31	36,42
Gastos MObra/Receita Total (%)		14	11	14	13	11	22
Perda por morte (%)		31,62	57,54	274,29	94,32	191,94	32,27
CCS (unidade)		216.390	209.000	220.223	226.856	294.856	311.229
CBT (unidade)		17.930	15.492	11.271	14.815	17.146	12.728
Gordura (unidade)		3,83	3,82	3,71	3,73	3,74	3,79
Proteína (unidade)		3,26	3,21	3,17	3,22	3,22	3,22

**Fonte:** dados da pesquisa

## Conclusões

O estudo analisou propriedades de gado leiteiro no período de julho a dezembro de 2012 a fim de testar conceitos financeiros e econômicos, visando analisar o desempenho mensal. A amostragem considerada neste estudo foi intencional, o que impede que os resultados obtidos sejam considerados representativos do universo de produtores brasileiros. Portanto, foram considerados somente produtores que têm forte vínculo econômico com a atividade leiteira. Ainda assim, em média, 23% das propriedades mostraram-se insolventes, nos meses analisados. Num outro extremo, 30% das propriedades obtiveram resultados muito favoráveis, o que garante sustentabilidade econômica. As demais, que foram a maioria dos casos obtidos na amostra, mostraram dificuldades para cobrir todos os gastos de produção.

Vale ressaltar, contudo, que os dados analisados referem-se ao levantamento de seis meses, portanto ainda é cedo para se fazer qualquer afirmação sobre a saúde financeira destas propriedades. O fato marcante deste estudo é que ficou demonstrado ser possível adotar em propriedades leiteiras abordagens metodológicas consagradas em outras atividades econômicas, mas que ainda não são utilizadas na atividade leiteira para aferição de desempenho. A aplicação desta metodologia nas propriedades irá possibilitar a obtenção de um conjunto de boas práticas de manejo e gestão que poderão trazer indicativos interessantes para os produtores, atendendo a uma antiga demanda do setor produtivo em relação à pesquisa, pois o Brasil ainda não tem sistemas de produção estáveis, padronizados, que sejam indicados aos produtores de modo seguro pelos técnicos. O Brasil ainda não tem, também, *benchmarks* que sejam referências para os produtores.

## **Agradecimentos**

À Fapemig

## **Literatura citada**

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em:  
<[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil\\_2006/Brasil\\_censoagro2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf)> Acesso em: 5 mar. 2012.

IBGE. Disponível em:  
<[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2093](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2093)>. Acesso em: 5 mar. 20

# **Estruturação de banco de dados para tomada de decisão em programas de controle e prevenção da mastite (resultados parciais)**

Raíssa Salomão Ozório<sup>1</sup>, Andrea Freguglia Bruno<sup>2</sup>, Samuel Miguel Hylario<sup>3</sup>, Juliana de Lima Brandão Guimaraes<sup>4</sup>, Victor Muiños B. Lima<sup>5</sup>, Mário Baptista L. Júnior<sup>5</sup>, Leandro Rubiale<sup>5</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>5</sup>, Márcio Roberto Silva<sup>5</sup>, Guilherme N. Souza<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica (Embrapa Gado de Leite), Graduanda em Medicina Veterinária/UNIPAC Campus Juiz de Fora. E-mail: rah\_ozorio@hotmail.com

<sup>2</sup>Bolsista de Iniciação Científica (CNPq), Graduanda em Medicina Veterinária/UNIPAC Campus Juiz de Fora. E-mail: andreamais@gmail.com

<sup>3</sup>Bolsista de Iniciação Científica (CNPq), Graduando em Medicina Veterinária/UNIPAC Campus Juiz de Fora. E-mail: hylariosamuel@hotmail.com

<sup>4</sup>Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados – UFJF

<sup>5</sup>Membros da Equipe de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação da Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi apresentar os dados cadastrados no sistema de informação “Gestão Informatizada de Sistemas de Produção de Leite” (GisLeite) e sugestões de melhoria na entrada de dados sobre a saúde da glândula mamária e nos relatórios de monitoramento da saúde da glândula mamária. Foram cadastradas 1.866 vacas oriundas de 42 rebanhos. Foram obtidas as coordenadas geográficas de 74 fazendas por meio da utilização de equipamentos eletrônicos (GPS). Para agilizar o processo de lançamentos de dados no GisLeite, foi incluído um novo campo para dados de Contagem de Células Somáticas (CCS) de vacas em frente os dados do controle leiteiro no respectivo mês. Foi sugerido a inclusão de relatórios sobre a dinâmica das infecções subclínicas no período seco e a informação de quanto cada vaca em lactação contribui na CCS do rebanho. Foi observado maior agilidade na entrada de informações no GisLeite e com a inclusão de novos relatórios espera-se aumentar o poder de tomada de decisão no controle e prevenção da mastite.

**Palavras-chave:** base de dados, glândula mamária, mastite, monitoramento.

**Abstract:** The aim of this study was to present the recorded data “Gestão Informatizada de Sistemas de Produção de Leite” (GisLeite) and suggestions for improving input data about udder health and monitoring report about mastitis. One thousand eight hundred sixty six cows from 42 dairy herds were registered. The coordinate geographic form 74 dairy herds were obtained through electronic equipments (GPS). To expedite the process of input data in GisLeite it was included a new field for Somatic Cell Count (SCC) as well as reports on the dry period and contribution of each cow on bulk tank SCC. The input of data in GisLeite was faster and the inclusion of new reports will increase the decision make with goal of mastitis control and prevention.

**Keywords:** database, mammary gland, mastitis, monitoring.

## **Introdução**

A mastite é uma doença endêmica nos rebanhos leiteiros em todo o mundo e causa, entre outros problemas, as maiores perdas econômicas relacionada às doenças da produção (BENNET et al., 1999; HALASA et al. 2007). Vários estudos têm estimado o custo associado com a mastite, entretanto estes estudos usam diferentes métodos de avaliação, populações em risco e maneiras de mensurar a doença e influência dos efeitos desta sobre a produção.

As decisões econômicas relativas ao controle da mastite baseiam-se no custo de casos clínicos e subclínicos em relação aos custos dos procedimentos de manejo. Estas

decisões podem ser tomadas em três níveis: 1) em nível de quarto mamário/vaca; 2) em nível de fazenda e 3) em nível de região/país. Decisões em nível de quarto mamário/vaca são aquelas relacionadas a uma vaca individual, por exemplo, o tratamento de casos clínicos, subclínicos ou descarte de animais. Entretanto, o tratamento de uma vaca individual pode ser considerada também como uma decisão em nível de fazenda, pois esta medida previne novos casos de mastite. Decisões em nível de fazenda são aquelas relativas às medidas de controle e prevenção da doença. Os benefícios destas medidas de controle recaem sobre a redução na incidência de casos clínicos e subclínicos e na melhoria da qualidade do leite.

A expansão do conhecimento de epidemiologia aplicada à medicina veterinária tem sido significativa devido ao grande progresso, sofisticação e disponibilidade de métodos estatísticos, softwares, computadores e habilidade em trabalhar com grandes bases de dados, que permitiram quantificar e identificar relações entre doença, produção, reprodução e descarte de vacas leiteiras (LeBLANC et al., 2006). Em função dos recursos tecnológicos disponíveis atualmente e a aplicação do conhecimento de epidemiologia, um dos principais objetivos de pesquisas na área é quantificar a ocorrência de doenças em uma determinada região e avaliar a distribuição e determinantes de doenças envolvendo o componente espacial e/ou temporal (CARPENTER, 2001).

A estruturação de bancos de dados informatizados (base de dados) vem se expandindo rapidamente e fornece um excelente meio para armazenar informações e realizar a análise de dados relativos à saúde dos rebanhos (THRUSFIELD & NOORDHUIZEN, 2001), que pode ser aplicado especificamente para o monitoramento da saúde da glândula mamária dos rebanhos leiteiros.

O objetivo deste trabalho é apresentar os dados cadastrados no sistema de informação Gestão Informatizada de Sistemas de Produção de Leite (GisLeite) até o momento, bem como as melhorias propostas para a entrada de dados relativo à saúde da glândula mamária e os relatórios de rebanhos e indivíduos sobre mastite clínica e subclínica.

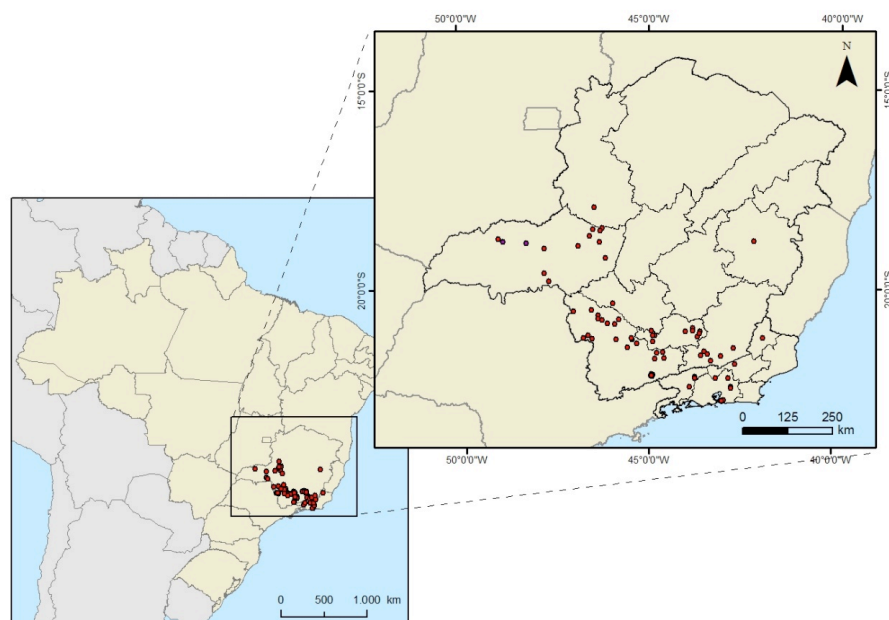
## **Material e Métodos**

Para esse projeto foi utilizado o sistema de informação “Gestão Informatizada de Sistemas de Produção de Leite” (GisLeite). Este sistema de informação possui uma estrutura de base de dados que permite o armazenamento contínuo de um grande volume de informações. As informações sobre características de animais foram obtidas do “Relatório 2” da Associação dos Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais (ACGHMG). As coordenadas geográficas de 74 rebanhos foram obtidas pelos controladores da ACGHMG por meio do equipamento GPSMAP® 60CSx (GARMIN) no momento da visita para mensurar a produção de leite das vacas em controle leiteiro.

## **Resultados e Discussão**

O projeto em questão encontra-se em fase de obtenção dos dados relativos a características de indivíduos, estado de saúde da glândula mamária, coordenadas geográficas das fazendas e as medidas de controle e prevenção da mastite adotadas nestas fazendas. Desta forma, não há resultados com análises estatísticas para realizar inferências sobre a população estudada. Entretanto, atualmente há 1.866 vacas vinculadas a 42 fazendas e as coordenadas geográficas de 74 fazendas cadastradas na base de dados do GisLeite. Durante o lançamento de dados no GisLeite foi observado que a agilidade no armazenamento destes dados dependia da velocidade de conexão com a internet, tendo em vista que o GisLeite é uma ferramenta disponível na “web”. Porém, foi observado que a forma de entrar com os dados poderia ser agilizada adicionando-se um novo campo para entrada de dados de contagem de células somáticas (CCS) de indivíduo em frente a produção de leite do animal no respectivo mês. Esta alteração permitiu que após o cadastro dos animais de um rebanho, todas as produções de leite dos animais e respectivas CCS poderão ser armazenadas no GisLeite em uma mesma “máscara”. Com

relação aos relatórios gerados para avaliação e monitoramento da saúde da glândula mamária, estão sendo adicionados novos relatórios que mostram a dinâmica das infecções intramamárias no período seco e a contribuição em percentual das vacas em lactação para a CCS do rebanho (leite do tanque).



**Figura 1.** Localização geográfica dos rebanhos da Associação dos Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais (ACGHMG) cadastrados no GisLeite em março de 2012.

## Conclusões

O GisLeite demonstrou ser um sistema de informação viável para armazenamento de dados com objetivo de realizar avaliação, monitoramento e estudos epidemiológicos com foco na saúde da glândula mamária. Apesar de ter sido sugerido melhorias para a entrada de dados de produção e CCS de indivíduos no GisLeite, o sistema não apresentou maiores dificuldades para realização das atividades de lançamento dos dados. A inclusão de relatórios relativos ao período seco e contribuição individual de vacas na CCS do rebanho (tanque de expansão) aumentará o poder de tomada de decisão no que se refere ao controle e prevenção da mastite.

## Agradecimentos

À Fapemig.

## Literatura Citada

- BENNET, R.M., CHRISTIANSEN, K., CLIFTON-HADLEY, R.S. Estimating the costs associated with endemic diseases of dairy cattle. **Journal Dairy Research**, v.66, p.455-459, 1999.
- CARPENTER, T.E. Methods to investigate spatial and temporal clustering in veterinary epidemiology. **Preventive Veterinary Medicine**, v.48, p.303-320, 2001.
- HALASA, T., HUIJPS, K., OSTERAS, O., HOGEVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis management: a review. **Veterinary Quarterly**, v.29, n.1, p.18-31, 2007.

LEBLANC, S.J., LISSEMORE, K.D., KELTON, D.F., DUFFIELD, T.F., LESLIE, K.E. Major advances in disease prevention in dairy cattle. **Journal Dairy Science**. v.89, n.4, p.1267-1279, 2006.

THRUSFIELD, M.V., NOORDHUIZEN, J.P.T.M. **Current areas of application of epidemiology and perspectives**. In: NOORDHUIZEN, J.P.T.M. et al. (Ed.) Application of quantitative methods in veterinary epidemiology. Wageningen: Wageningen Pers, 2001. p.13-30.



# Frequências Genotípicas e Alélicas do Gene da Kappa-Caseína

## Genotypic and Allelic Frequencies of the Kappa-Casein Gene

Willian Pascoa Pereira<sup>1</sup>, Isabela Gomes Barreto da Motta<sup>1</sup>, Isabela Fonseca<sup>2</sup>, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>3</sup>, Wagner Antonio Arbex<sup>4</sup>, Ítala Iara Medeiros de Araújo<sup>5</sup>, Marcos Vinícius G. B. Silva<sup>6</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Alunos de Graduação do Curso de Ciências Biológicas - CES-JF/ Juiz de Fora. E-mail: willp\_2@hotmail.com, mottaigb@hotmail.com.

<sup>2</sup>Doutoranda em Genética e Melhoramento - UFV/ Viçosa. Bolsista CNPq. E-mail: isabela\_fonseca@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Bolsista Pós-doutorado PNPd/CAPES - Juiz de Fora. E-mail: alesi\_vet@hotmail.com.

<sup>4</sup>Analista da Embrapa Gado de Leite. E-mail: wagner.arbex@embrapa.br

<sup>5</sup>Mestranda em Zootecnia - UFRPE/ Pernambuco. E-mail: itala\_iara@yahoo.com.br.

<sup>6</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. E-mail: marcos.vb.silva@embrapa.br, marta.martins@embrapa.br

**Resumo:** Diversos estudos têm indicado que algumas variantes de proteína de leite podem estar associadas com a produção e composição do leite e produção de queijo. O gene da  $\kappa$ -caseína foi atribuído ao cromossomo 6 (6q31) em bovinos e duas variantes da  $\kappa$ -caseína foram descritas em detalhes como  $\kappa$ -caseína A e B. A diferença entre A e B encontra-se em uma única substituição de aminoácidos nas posições 136 e 148. Com o objetivo de verificar as frequências genotípicas e alélicas do gene *CSN3* em uma população participante do Teste de Progenie da Raça Girolando, foram genotipados 778 animais. As frequências genotípicas encontradas foram 0,7316 (AA), 0,2477 (AB) e 0,0207 (BB) enquanto as frequências alélicas foram 0.8541 (A) e 0.1459 (B). Tal população encontra-se em EHW para o gene *CSN3* a 5% de probabilidade visto que as frequências observadas não diferem das frequências esperadas no equilíbrio.

**Palavras-chave:** *CSN3*, produção de leite, proteína do leite.

**Abstract:** Many studies have indicated that some variants of milk protein may be associated with milk production, milk composition and cheese production. The  $\kappa$ -casein gene was assigned to chromosome 6 (6q31) in cattle and two variants of  $\kappa$ -casein were described in detail as  $\kappa$ -casein A and B. The difference between A and B is a single amino acid substitution at positions 136 and 148. In order to verify the genotypic and allelic frequencies of the *CSN3* gene in cattle participant of the Progeny Test of Girolando breed were genotyped 778 animals. The genotypic frequencies found were 0.7316 (AA), 0.2477 (AB) and 0.0207 (BB) while the allelic frequencies were 0.8541 (A) and 0.1459 (B). Such population finds itself in HWE for the *CSN3* gene at 5% probability since observed frequencies do not differ from expected frequencies on the equilibrium.

**Keywords:** *CSN3*, milk production, milk protein

## Introdução

O polimorfismo genético das proteínas do leite tem recebido considerável interesse de pesquisa nos últimos anos por causa de possíveis associações entre os genótipos de proteínas do leite e características de importância econômica em rebanhos leiteiros. Diversos estudos têm indicado que algumas variantes de proteína de leite podem estar associadas à produção (NG-KWAI-HANG et al, 1984) e composição do leite e, também, à produção de queijo (NG-KWAI-HANG, 1998). Portanto, genes de proteínas do leite podem ser utilizados como marcadores genéticos para critérios de seleção adicionais na criação de gado leiteiro.

As principais proteínas do complexo de caseínas no leite de vaca são  $\alpha$ s1,  $\alpha$ s2  $\beta$  e  $\kappa$ -caseínas, sendo que cada um deles pode ocorrer na forma de duas ou mais variantes, com herança mendeliana simples. A proteína  $\kappa$ -caseína é um polipeptídeo de cadeia única

com 169 aminoácidos e peso molecular de 19,2 kDa, e desempenha papel importante na química do leite, fornecendo estabilidade coloidal à micela de caseína. Tem se especulado que moléculas individuais de k-CN se transformem em polímeros com uma estrutura tal que as caudas hidrofílicas se projetam para o soro de leite e as regiões hidrofóbicas anexam-se ao núcleo da micela. Além da função natural da k-caseína, de manter a micela em suspensão, a k-caseína é rapidamente hidrolisada quando o leite está no estômago do bezerro, permitindo a formação de um coágulo que podem ser prontamente digerido. A quimosina, uma enzima do abomaso do bezerro, cliva a k-caseína muito especificamente para produzir insolúveis para-k-caseína, que permanece na superfície da micela e faz com que a micela se agregue e formar um coágulo. (Creamer et al., 1998)

O gene CSN3 foi atribuído ao cromossomo 6 (6q31) em bovinos (THREADGILL E WOMACK, 1990) e duas variantes da  $\kappa$ -caseína foram descritas em detalhes como  $\kappa$ -caseína A e B. A diferença entre A e B encontra-se em uma única substituição de aminoácidos nas posições 136 (Treonina por Isoleucina) e 148 (Acido Aspartico por Alanina) (EIGEL et al., 1984).

Foi verificado que animais com o genótipo BB apresentam maior produção de proteínas no leite em comparação com os de genótipo AA. O genótipo BB está associado a características superiores de processamento para produção de queijo como menor tempo de coagulação, coágulo com maior densidade, resultando assim em um maior rendimento deste produto. Ainda, animais com o genótipo BB apresentam um rendimento 12% maior para produção de queijo mussarela e 8% para queijo tipo cheddar em relação a animais com genótipo AA. Os animais com genótipo AB apresentam rendimento intermediário entre os genótipos BB e AA, enquanto que os animais com genótipo AA possuem o genótipo menos favorável para a produção de queijo (Barroso et al. 1998).

O presente trabalho teve como objetivo avaliar as frequências alélicas e genotípicas do gene *CSN3* e verificar se este se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população analisada.

## Material e Métodos

Foram genotipados 778 animais para o gene da  $\kappa$ -caseína, sendo 122 machos e 656 fêmeas participantes do Programa de Melhoramento da Raça Girolando, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e Associação Brasileira dos Criadores de Girolando.

A extração do DNA do sangue e sêmen dos animais foi feita utilizando o DNeasey® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras foi feita por espectrofotometria (Nanodrop®, Wilmigton, DE, EUA). Os genótipos foram estabelecidos utilizando a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), tendo as condições otimizadas com relação à concentração de reagentes e temperatura de anelamento usando termociclador GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A digestão foi feita utilizando a enzima *Hinf* I (New England Biolabs, EUA) e os fragmentos formados foram observados em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio.

No gene da  $\kappa$ -caseína o genótipo AA é caracterizado pela presença de três fragmentos, um de 326, um de 100 e outro de 27 pb; o genótipo AB é caracterizado pela presença de quatro fragmentos (426, 326, 100 e 27 pb); e o genótipo BB apresenta apenas dois fragmento, um de 426 e outro 27 pb.

As frequências alélicas, genotípicas e o cálculo da probabilidade de EHW foram estabelecidos por meio do programa Popgene 1.32 (Yeh et al., 1997). A probabilidade de EHW associado às frequências genotípicas observadas foi testada pelo teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

As frequências genotípicas do gene da  $\kappa$ -caseína foram 0,7316 (AA), 0,2477 (AB) e 0,0207 (BB) enquanto as frequências alélicas foram iguais a 0.8541 (A) e 0.1459 (B) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Frequências alélicas e genotípicas do gene CSN3.

Genótipo	Número de Animais		Frequência		EHW*
	Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
AA	567	567,4958	0,7316	0,8541 (A)	0,020405
AB	192	194,0084	0,2477		
BB	16	16,4958	0,0207	0,1459 (B)	

A = está associado com menor rendimento para a produção de queijo.

\*  $P > (0,05)$ .

B = está associado com maior rendimento para a produção de queijo.

Tal população encontra-se em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (que foi de 0,020405 de acordo com o teste do  $\chi^2$  (Qui-Quadrado)) para os alelos A e B do gene CSN3 a 5% de probabilidade visto que as frequências observadas e esperadas não diferem entre si.

## Conclusão

A partir dos dados analisados pode-se dizer que a população estudada encontra-se em EHW para o gene CSN3. A genotipagem dos animais pode auxiliar os produtores na seleção dos animais a serem inseridos em seus rebanhos visando uma maior produção de queijo.

## Agradecimento

À Fapemig

## Literatura Citada

BARROSO, A.; DUNNER, S.; CANON, J. Technical note: Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C, and E by means of polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Animal Science**, Vol 76, Issue 6 1535-1538. 1998.

EIGEL WN, BUTLER JE, ERNSTROM CA, FARRELL EM, HARWALKER VR, JENNEAS R AND WHITNEY RM (1984) Nomenclature of proteins of cow milk: Fifth revision. **J Dairy Sci** 67:1599-1631.

CREAMER, L.K, PLOWMAN, J.E., LIDDELL, M.J., SMITH, M.H., HILL, J.P (1998) Micelle Stability: k-Casein Structure and Function. **J Dairy Sci** 81:3004–3012.

NG-KWAI-HANG KF, HAYES JE, MOXLEY JD AND MONARDES HG (1984) Association of genetic variants of casein and milk serum protein with milk fat and protein production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science** 67:835-40.

NG-KWAI-HANG KF (1998) Genetic polymorphism of milk proteins: Relationship with production traits, milk composition and technological properties. **Can Journal of Animal Science** 78 (Suppl):131-147.

THREADGILL DW AND WOMACK JE (1990) Genome analysis of the major bovine milk protein genes. **Nucleic Acids Res** 18:6935-6942.

YEH, F.C.; YANG, R.C.; BOYLE, T.B.J. **POPGENE (VERSION 1.32)**: Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: University of Alberta. 1997.

# **Comparação entre cenários futuros de distribuição geográfica do *Sipha flava* no Brasil com base no Terceiro e no Quarto Relatórios de Avaliação do IPCC**

**Comparison between the geographic distribution of *Sipha flava* based on the future scenario in the Third and Fourth Assessment Report of the IPCC climate change in Brazil.**

Letícia d'Agosto Miguel Fonseca<sup>1</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>2</sup>, Alexander Machado Auad<sup>2</sup>, Maryá Cristina Rabelo<sup>1</sup>, Thiago Gerheim Andrade<sup>1</sup>, Emília Hamada<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Estagiários(as) da Embrapa Gado de Leite – Estudantes do curso de Geografia da UFJF

<sup>2</sup> Pesquisadores – Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup> Pesquisadora – Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** O trabalho visou comparar os resultados da distribuição geográfica do *Sipha flava* com base no Terceiro e no Quarto Relatório de Avaliação do IPCC no território brasileiro. O afídeo apresenta ampla distribuição geográfica, e pode causar danos às diversas culturas utilizadas na alimentação do gado de leite. As imagens que contêm as médias de temperatura com tamanho de 30' (meio grau) cada pixel, dos relatórios do IPCC foram classificadas de acordo com as faixas de temperatura de sobrevivência do inseto, realizadas em laboratório por Oliveira et al. (2009), assim foi possível gerar o cenário A2 para os anos 2020, 2050 e 2080 (cenário em que o aquecimento traria modificações drásticas para o clima) com base no Quarto Relatório (IPCC, 2007). O software ArcGIS foi utilizado na confecção dos mapas para o Quarto Relatório. A comparação dos mapas para os relatórios em questão mostrou que em termos de regiões, a favorabilidade continua com a mesma tendência para os meses de temperaturas médias mais altas no ano de 2020, mas com algumas modificações nos estados abrangidos. Observa-se um aumento das áreas não favoráveis nos anos de 2050 e 2080 nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste.

**Palavras-chave:** Mudanças climáticas, *Sipha flava*, IPCC.

**Abstract:** This study aimed to compare the results of the geographical distribution of *Sipha flava* based on the Third and Fourth Assessment Report of the IPCC climate change in Brazil. The aphid has a wide geographical distribution, and it can cause damages to various crops used for feeding dairy cattle. The images that contains the average temperature size of 30' (half a degree) each pixel of the IPCC reports were classified according to the temperature range of survival of the insect, it was performed in the laboratory by Oliveira et. Al. (2009), and was possible to generate the A2 scenario for the years 2020, 2050 and 2080. (this climate scenario warming would bring drastic changes). The software ArcGIS was used by making maps for the Fourth Report. The comparison of reports maps showed that in terms of regions, the favorability continues with the same trend for the months of higher average temperatures in 2020, but it showed some differences in the states covered, there was also an increase in areas that were not favorable in the years 2050 and 2080 in the North, Northeast and Midwest regions.

**Keywords:** Climatic change, *Sipha flava*, IPCC.

## **Introdução**

Diversos fatores ambientais são responsáveis pela distribuição geográfica da fauna e da flora no nosso planeta, sendo eles a temperatura, CO<sub>2</sub>, radiação, umidade, precipitação, nutrientes, dos quais, a temperatura pode afetar as condições necessárias à vida de determinada espécie em termos de mudanças climáticas.

Os avanços na compreensão de como o clima está mudando em termos espaciais e temporais tem melhorado e ampliado os numerosos conjuntos de dados referentes aos gases de efeito estufa, atividade solar, propriedades físicas da terra, e alguns aerossóis, o que influencia no balanço de energia do sistema terra-atmosfera. Assim, a partir dos dados do Quarto Relatório de mudanças climáticas do IPCC (2007) foi realizada a distribuição geográfica do *Sipha flava* com o objetivo de comparar os resultados obtidos com o trabalho realizado anteriormente com base nos dados do Terceiro Relatório do IPCC (2001) para o mesmo inseto.

Dentre as espécies relatadas como pragas, o *Sipha flava* (FORBES, 1884), conhecida como “pulgão amarelo”, pertencente à família Aphididae, compõe um dos grupos mais importantes de todo mundo, do ponto de vista da economia agrícola (OLIVEIRA, et. al. 2007). Encontram-se amplamente distribuídos pelo território nacional e estão associados a vários tipos de cereais, tais como a cana-de-açúcar, trigo, cevada, centeio e gramíneas forrageiras, deste modo, o pulgão é um problema para o desenvolvimento de espécies utilizadas na alimentação do gado de leite.

## Material e Métodos

Os estudos na mudança do clima pelo IPCC apontam um aumento da média da temperatura global em dois cenários distintos. Apresentando o cenário A de elevadas emissões, mantendo o atual padrão de emissões de gases de efeito estufa, e o cenário B que descreve um cenário mais otimista, com soluções locais para sustentabilidade econômica, social e ambiental.

As pesquisas realizadas por Oliveira et al. (2009) sobre diferentes faixas de temperaturas para a sobrevivência do *Sipha flava* concluíram que a maior longevidade, bem como a maior esperança de vida para *S. flava* ocorreu a 12 °C e as maiores taxas de mortalidade foram observadas a 28 °C e 32 °C, temperaturas estas obtidas em experimentos de laboratório. Com base nestas faixas de temperatura, e com o prognóstico do IPCC, foram traçadas faixas de temperatura onde haveria a maior possibilidade de sobrevivência do inseto.

Para a elaboração dos mapas temáticos referentes ao Quarto Relatório com base no cenário A, utilizou-se as médias mensais de temperatura divididas em 3 mapas, trazendo um prognóstico nas décadas de 2020, 2050 e 2080. O trabalho foi realizado no software ArcGIS 9.3 que permitiu a separação das classes de temperatura, correlacionando com as conhecidas faixas de sobrevivência do *Sipha flava*, permitindo a localização de possíveis áreas-problema com relação à presença do inseto.

Foi selecionado o mês de Junho para avaliação da área de abrangência do *Sipha flava* nos dois modelos de relatório do IPCC, o qual apresenta as condições térmicas bastante favoráveis ao desenvolvimento do inseto em questão.

## Resultados e Discussão

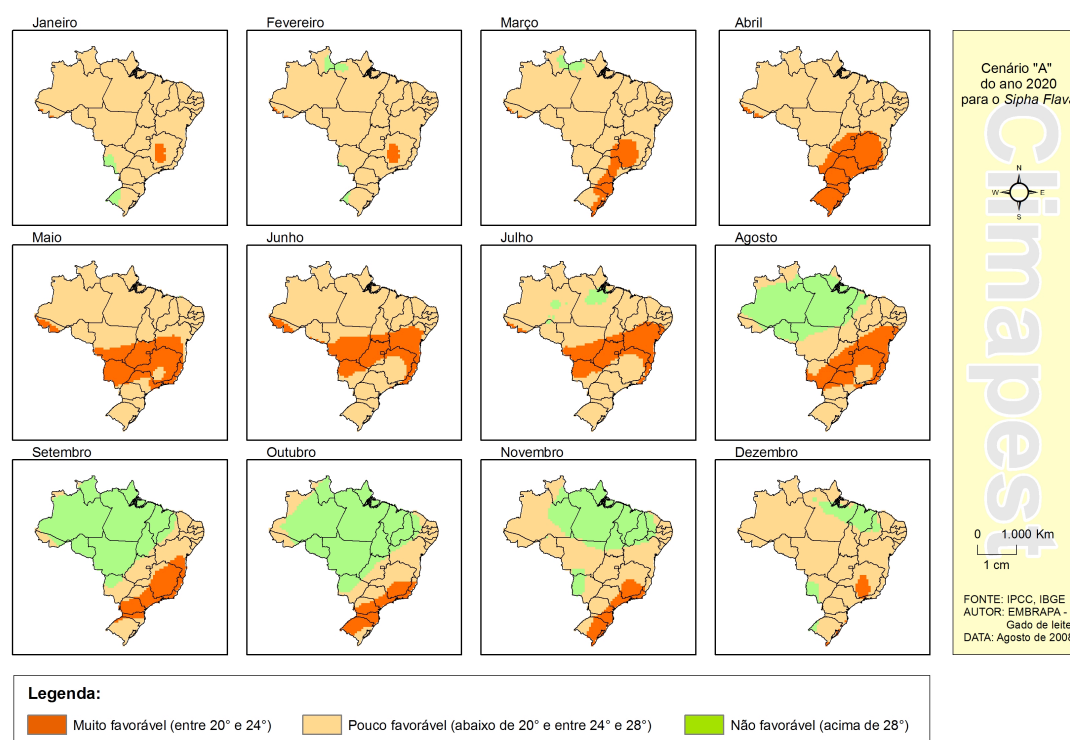
O projeto levou em consideração somente um fator climático para a distribuição do inseto no território brasileiro, portanto outros parâmetros podem ser utilizados para uma melhor compreensão da incidência do *Sipha flava*, bem como a confecção de novos mapas. Contudo, com os resultados obtidos é possível vislumbrar as regiões em que a temperatura é favorável ou não para o desenvolvimento do inseto com base no cenário A do IPCC. Em comparação do Terceiro com o Quarto Relatório, percebe-se que há uma tendência à favorabilidade de sobrevivência do inseto nas mesmas regiões para todos os anos, com um pequeno aumento da extensão dessas áreas nos cenários do Quarto Relatório. Observa-se que a espacialização do inseto-praga para a classe muito favorável no ano de 2020 manteve as mesmas regiões sazonais características, (aumentando ou diminuindo a influência em alguns estados) transitando entre as regiões sul e sudeste nos meses de temperatura média mais alta. Nos meses de temperaturas mais baixas manteve-se a região sudeste em adição à região centro-oeste.

Houve um aumento significativo das áreas não favoráveis ao desenvolvimento do afídeo para o ano de 2050 no Quarto Relatório, predominantemente em áreas que antes eram pouco favoráveis. Nos meses de temperaturas médias mais altas, aparecem áreas muito favoráveis no sul e sudeste. Já em 2080 houve a diminuição da favorabilidade nos meses com temperaturas médias mais baixas.

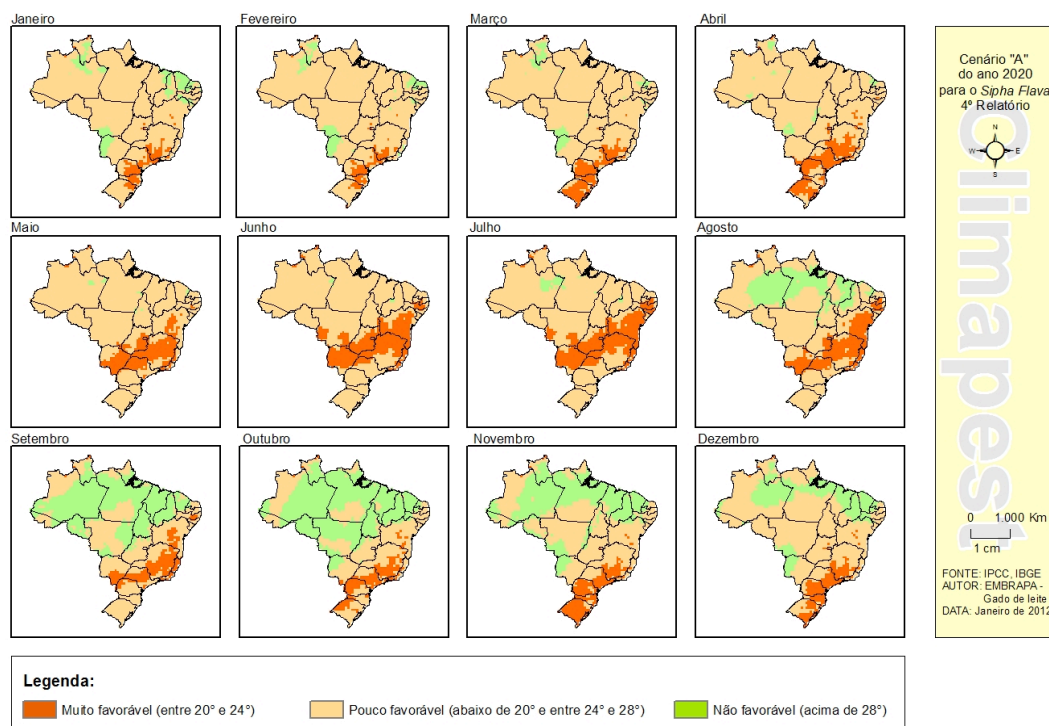
De acordo com a Tabela 1, observa-se um decréscimo importante das áreas muito favoráveis (classe entre 20ª e 24ª) à sobrevivência do *Sipha flava* do 3º relatório para o 4º relatório no mês de junho, mês que detém temperaturas próximas à favorabilidade típica para o inseto, obtida por meio dos ensaios de laboratório. A tabela aponta um resultado positivo para a pecuária em termos de favorabilidade à praga que vai diminuindo a cada cenário espaço-temporal em ambos os relatórios, substituindo a classe “Muito favorável” pelo “Pouco favorável” em algumas regiões, principalmente nas porções central e sudeste do país.

**Tabela 1.** Área em km² para a classe muito favorável ao desenvolvimento ao inseto no mês de junho

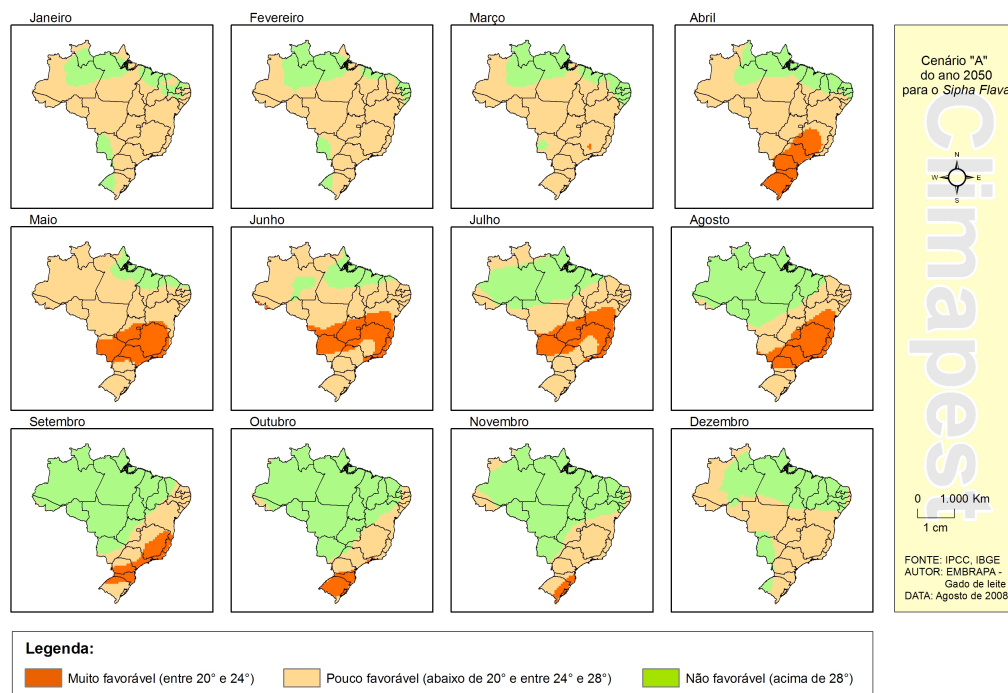
Ano	Cenário A2 Junho/Muito Favorável (km²)	
	3º Relatório	4º Relatório
2020	1.999.836,55	1.732.767,65
2050	1.726.408,95	1.201.809,52
2080	1.287.653,03	724.900,97



**Figura 1.** Favorabilidade de sobrevivência do *Sipha flava* para 2020 em A2 no Terceiro Relatório.



**Figura 2.** Favorabilidade de sobrevivência do *Sipha flava* para 2020 em A2 no Quarto Relatório.



**Figura 3.** Favorabilidade de sobrevivência do *Sipha flava* para 2050 em A2 no Terceiro Relatório.



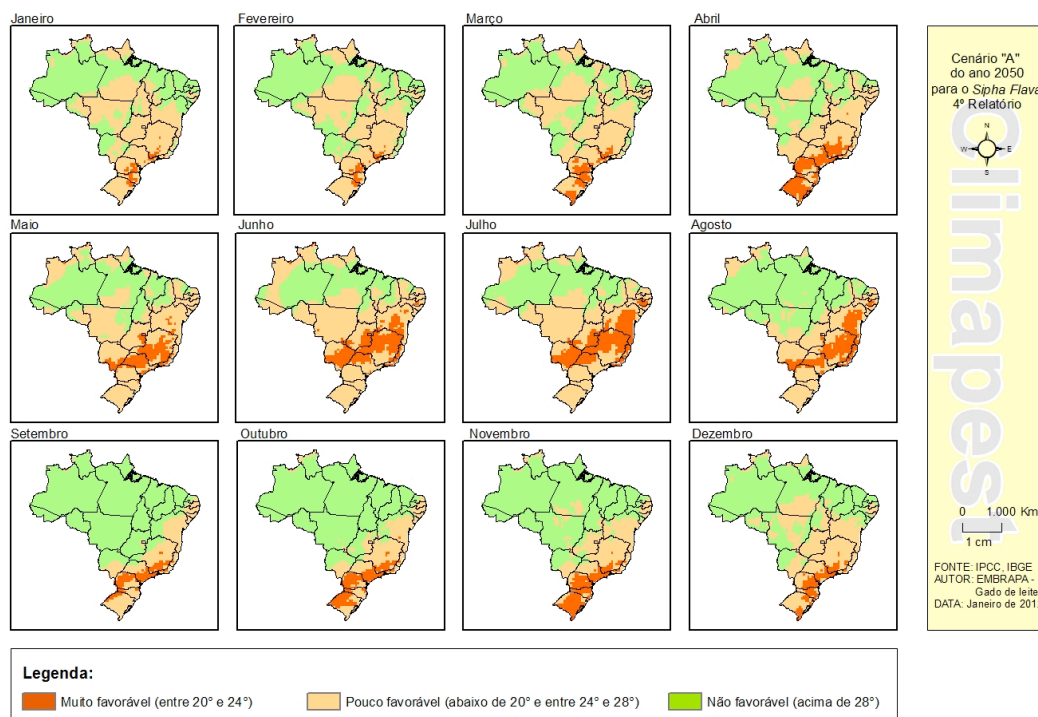


Figura 4. Favorabilidade de sobrevivência do *Siphia flava* para 2050 em A2 no Quarto Relatório.

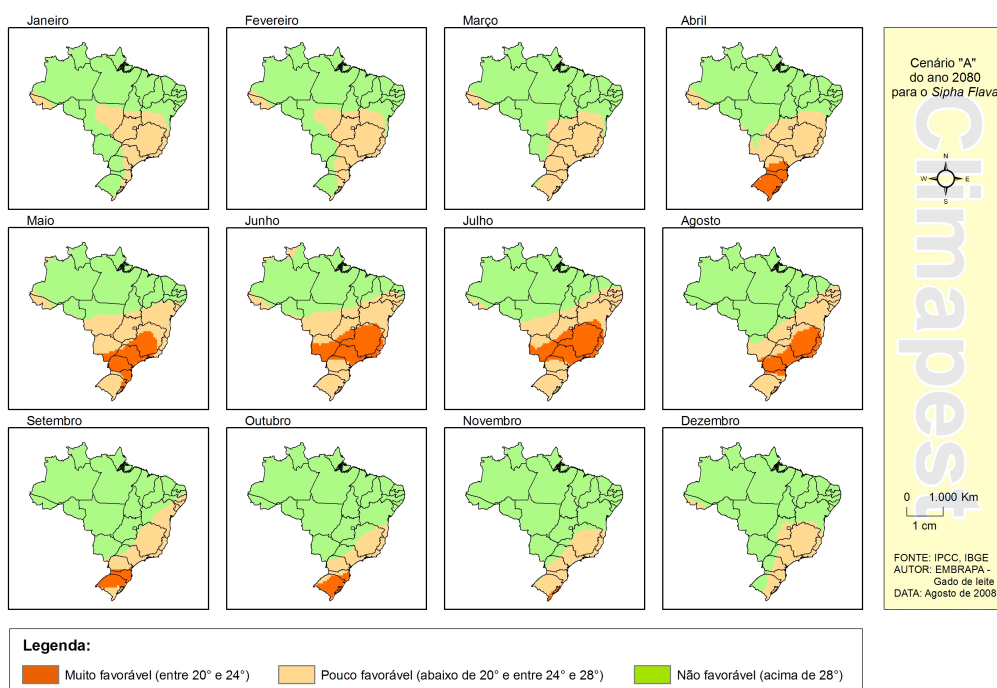
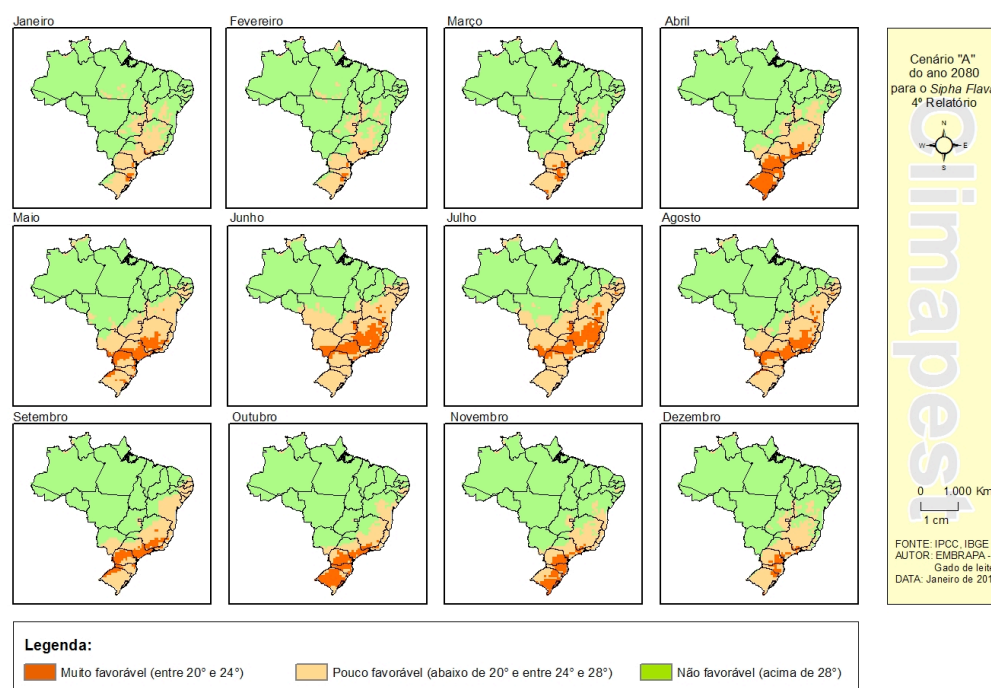


Figura 5. Favorabilidade de sobrevivência do *Siphia flava* para 2080 em A2 no Terceiro Relatório.



**Figura 6.** Favorabilidade de sobrevivência do *Sipha flava* para 2080 em A2 no Quarto Relatório.

## Conclusões

O SIG utilizado apresentou eficiência na elaboração dos mapas, que apontaram para uma possível diminuição das regiões onde o *Sipha flava* possa sobreviver, visto que, há um gradativo aumento da temperatura média, e conforme a temperatura aumenta, diminui a incidência do inseto, bem como observa-se uma mudança na distribuição geográfica em comparação com os dois relatórios analisados. De acordo com a avaliação das áreas de abrangência do inseto no mês de junho, conclui-se que o modelo apresentado pelo 4º Relatório tende a diminuir a condição de sobrevivência do inseto.

## Agradecimentos

À Fapemig

À Embrapa Gado de Leite pelo apoio na execução deste trabalho, e à Embrapa Meio Ambiente pelo convite a participar deste projeto.

## Literatura Citada

OLIVEIRA, A. O.; SOUZA, B.; AUAD, A. M.; SILVA, D. M.; SOUZA, L. S.; CARVALHO, C. A. Desenvolvimento e Reprodução de *Sipha flava* (Forbes) (Hemiptera: Aphididae) em Diferentes Temperaturas. **Neotropical Entomology**, v. 38, n. 3, p. 311-316, 2009.

OLIVEIRA, S. A.; AUAD, A. M.; FERREIRA, R. B.; SOUZA, L. S.; BRAGA, A. L. F.; AMARAL, R. L. Fertilidade de *Sipha flava* (FORBES, 1884) alimentados em Capim-Elefante em Diferentes Temperaturas In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 8., 2007, Caxambu. **Anais...** Caxambu: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2007.

IPCC. **The SRES emissions scenarios**: the IPCC Data Distribution Centre. Disponível em: <<http://sedac.ciesin.columbia.edu/ddc/sres/index.html>> . Acesso em: 20 fev. 2012.

# **Dinâmica da cobertura florestal no município de Eldorado do Carajás/PA nas últimas décadas**

## **Dynamics of forest cover in Eldorado do Carajás municipality in recent decades**

Thiago Gerheim de Andrade<sup>1</sup>, Letícia d'Agosto Miguel Fonseca<sup>1</sup>, Maryá Cristina Rabelo<sup>1</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>2</sup>, Fábio Homero Diniz<sup>3</sup>, Kasper Kok<sup>4</sup>, Bas Arts<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Estudantes do curso de Geografia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Email: thiagogerheim@hotmail.com, marya.rabelo1@gmail.com, leticiafonseca.geo@gmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. Email: marcos.hott@embrapa.br

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, doutorando da Universidade de Wageningen. Email: fabio.homerodiniz@wur.nl

<sup>4</sup>Professor do Departamento de Ciências Ambientais, Universidade de Wageningen. Email: kasper.kok@wur.nl

<sup>5</sup>Professor do Grupo de Política de Conservação Florestal e da Natureza, Universidade de Wageningen. Email: bas.arts@wur.nl

**Resumo:** O presente trabalho tem como objetivo apresentar a dinâmica florestal no Município de Eldorado do Carajás no estado do Pará através de imagens do satélite Landsat-5 obtidas do INPE (Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais) referentes aos anos de 1985 a 2010. Nesta etapa classificamos o município com relação a áreas florestadas e áreas não florestadas no decorrer dos anos. Possivelmente, a diminuição significativa na área florestada está diretamente ligada a atividades econômicas como a extração de madeiras e também a pecuária leiteira existente na região como atividade de subsistência para a população dos assentamentos. Estes resultados serão úteis para uma possível tomada de decisões com relação ao reflorestamento de algumas áreas visando melhores condições para o desenvolvimento da pecuária leiteira na região.

**Palavras-chave:** Cobertura florestal, pecuária de leite, Eldorado do Carajás.

**Abstract:** This Study aimed to present Forest dynamics on Eldorado do Carajás in Pará State, through images provided by the satellite Landsat-5 obtained from INPE (National Institute for Space Research) for the years 1985 to 2010. In this stage it is classified the municipality about forest areas and non-forest areas over the years. It is possible that the significant decrease in the forest area is directly related to economic activities such as logging and also dairy farming in the region as a way of subsistence for the population of the settlements. These results will be useful for a possible decision making regarding the reforestation of some areas to obtain better conditions for the development of dairy farming in the region.

**Keywords:** Forest cover, dairy farming, Eldorado do Carajás.

### **Introdução**

Eldorado do Carajás é hoje uma das principais bacias leiteiras do Estado dividindo a produção com outras cidades do sudeste paraense, como Canaã dos Carajás, Jucundá, Paraupabas e Rondon do Pará. Em muitas pequenas propriedades tem se difundido a chamada pecuária mista: de corte e leite. Porém, a alguns anos, nota-se uma tendência para especialização da pecuária leiteira, com a chegada de animais das raças Gir e a Girolando. São 1,2 milhão de vacas ordenhadas por ano no Estado.

O município em questão está dividido em assentamentos e em média, cada gleba desses assentamentos tem uma área que varia de 25 ha a 50 ha. Acrescente-se a esse cenário, a pouca consciência ambiental e a carência total de tecnologia, sobretudo, no que diz respeito à produção de leite. Prova disso está nos números: a produção média diária do município é de 100 mil litros de leite, o que significa produção de 3,8 litros de leite por

vaca e de 90 litros de leite por propriedade, segundo informações do Sebrae Marabá e do Projeto Mais leite.

Com o intuito de analisar a dinâmica do desflorestamento no município, fenômeno geográfica diretamente ligado à intensificação da atividade agropecuária, foram elaborados mapas de uso das terras quanto à cobertura florestal para o período que compreende 1985 a 2010, por meio de imagens de satélite, em intervalos de 5 anos. Foram adotadas técnicas de classificação de imagens no Sistema de Informações Geográficas (SIG) para alcançar os resultados almejados.

## **Material e Métodos**

O estudo refere-se ao município de Eldorado do Carajás no estado do Pará, onde analisa-se as informações apresentadas a partir dos resultados gerados pelo software para realização de mapeamento temático e estimativa da cobertura das terras no município, por meio das imagens de satélite Landsat-5, sensor TM, que datam de Junho ou Julho de 1985 a 2010, com a utilização da base de pontos obtidos em campo, a qual se configura em verdade terrestre, útil no lançamento de amostras de treinamento e realização de um histórico florestal da área.

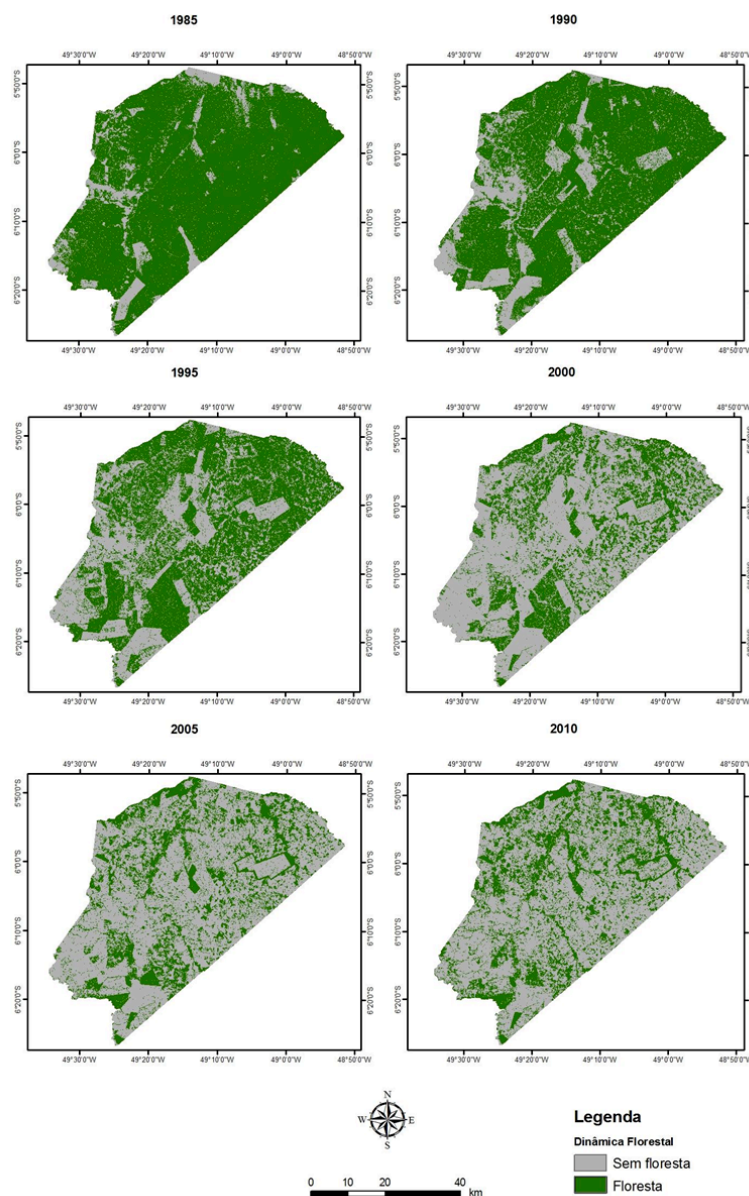
Numa etapa anterior do trabalho foram coletadas amostras de gradações de floresta, cultivos, solo e água, além de queimada e área urbana do município, foi possível fazer uma classificação do uso e cobertura e perceber quais os tipos de modificações ocorreram na paisagem e realizar-se uma reclassificação. Foram designadas as seguintes áreas finais, reclassificadas de uso e cobertura das terras: 1) Floresta (floresta ombrófila, secundária ou regenerações); 2) Atividade agropecuária (pastagem, cultura anual e outros cultivos perenes); 3) Água. Utilizou-se a transformação em Componentes Principais para a classificação dos alvos de interesse.

Posteriormente estas classificações foram condensadas em áreas florestadas e áreas não florestadas. E sobre esse aspecto apresentamos os resultados a seguir.

## **Resultados e Discussão**

Como era de se esperar com o passar dos anos as áreas não florestadas aumentaram significativamente, provavelmente isto se deve ao manejo agropecuário intensificado nessas terras nas últimas duas décadas, com o desenvolvimento da pecuária leiteira e ou de corte na região dos assentamentos, pois há a necessidade de pasto limpo para o gado. Outra característica possível para explicar essa grande quantidade de terras sem cobertura florestal poderia ser a extração de madeira, atividade econômica típica da região.

Percebe-se nos mapas apresentados, uma grande variação do índice de terras anteriormente ocupadas com florestas, e no decorrer dos 25 anos analisados como esse cenário tem modificado e como foi agravado principalmente a partir do ano 2000, onde percebemos uma maior remoção de florestas para a utilização dessas áreas com outros fins econômicos e de subsistência, dentre eles a pecuária leiteira como principal atividade econômica na região.



**Figura 1.** Mapas referentes ao progresso das áreas desmatadas no período analisado.

Na Tabela 1, está representada em números a área de florestas obtidas via classificação de imagens de satélite no decorrer do período, onde observa-se uma retração total de quase 62%, a despeito da distribuição heterogênea dos fragmentos e processo de desmatamento seguida de regeneração, com rearranjo dos talhões. Pelos dados obtidos, apenas no período compreendido entre 2005 e 2010 houve um aumento da cobertura florestal.

**Tabela 1.** Dinâmica da cobertura florestal para os períodos analisados.

Dinâmica florestal Período	Área Florestal Ano 1 (ha)	Área Florestal Ano 2 (ha)	Diferença (ha)	Diferença (%)
1985 - 1990	254.394	221.761	-32.633	-12,83
1990 - 1995	221.761	172.299	-49.462	-22,30
1995 - 2000	172.299	99.926	-72.373	-42,00
2000 - 2005	99.926	90.747	-9.179	-9,19
2005 - 2010	90.747	96.805	6.058	6,68

Pode-se destacar que poucas foram as áreas onde a floresta primária foi mantida no decorrer desses 25 anos, por meio da observação das imagens de satélite. Ocorre por vezes uma resiliência das áreas de florestas em meio a novos desmatamentos, já em talhões ou manchas de floresta secundária.

## **Conclusões**

A diminuição na área florestada no decorrer do período analisado, cerca de 60%, está, provavelmente, atrelada às questões socioeconômicas, extração madeireira e intensificação das atividades agropecuárias, pecuária leiteira e de corte, notadamente para fins de subsistência para a população dos assentamentos. No município ou mesmo no Estado existem algumas questões a serem resolvidas, no campo fundiário e agropecuário, tais como as pastagens degradadas, formadas há décadas, que jamais receberam a reposição dos nutrientes, e a extração madeireira, a qual foi, durante muito tempo, a principal fonte de riqueza do Estado, provocando grande devastação da floresta. O caminho mais eficiente para a geração de empregos é por meio da recuperação das áreas de pastagens degradadas, do reflorestamento e da implantação de um sistema sustentável de pecuária de leite ou corte. Contudo podemos dizer que a produção de leite é uma das melhores soluções para propiciar renda o ano todo para o produtor familiar. Estes resultados serão úteis para uma possível tomada de decisões com relação ao reflorestamento de algumas áreas visando melhores condições para o desenvolvimento da pecuária leiteira na região. Ressalta-se que outras abordagens em termos de classificação do uso das terras poderão ser adotadas para refinamento dos resultados.

## **Agradecimentos**

À Fapemig  
À Embrapa Gado de Leite pelo apoio ao trabalho  
À Universidade de Wageningen pela concessão da base de dados do projeto de pesquisa

## **Literatura Citada**

D'ALGE, J. C. L. **Geoprocessamento: teoria e aplicações**. São José dos Campos: INPE - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, 2001. Parte I, cap. 6: Cartografia para geoprocessamento.

HOMMA, A. K. O. Pecuária leiteira na Amazônia: sugestões para um programa de pesquisa a partir de uma perspectiva ambiental. In: WORKSHOP SOBRE IDENTIFICAÇÃO DAS PRINCIPAIS RESTRIÇÕES AO DESENVOLVIMENTO DA CADEIA PRODUTIVA DO LEITE DA REGIÃO NORTE DO BRASIL, 2003, Belém, PA. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2003. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 91).

MOREIRA, M. A. **Fundamentos do sensoriamento remoto e metodologias de aplicação**. Viçosa, MG: UFV, 2005.

SEBRAE. Disponível em: <http://blog.pa.sebrae.com.br/maraba/?p=374>. Acesso em: 24 fev. 2012.

# **Cenário de Áreas de Preservação Permanente: estudo de caso para a mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba**

## **Scenarios of Permanent Preservation Areas: case for the regions of Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba**

Maryá Cristina Rabelo<sup>1</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>2</sup>, Letícia d'Agosto Fonseca<sup>1</sup>, Thiago Gerheim de Andrade<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Estagiário(a) da Embrapa Gado de Leite – Estudante do curso de Geografia da UFJF, Juiz de Fora/Minas Gerais

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora

**Resumo:** O presente trabalho teve como objetivo criar um cenário de mapeamento de Áreas de Preservação Permanente (APP) para as regiões do Triângulo Mineiro e Alto do Paranaíba, observando as disposições do Código Florestal e resolução do Conama quanto à APP e estabelecer o impacto de sua implantação sobre a área de pastagens e, posteriormente, a produção de leite, analisando assim as áreas de pastagem como um dos fatores principais na cadeia produtiva destas regiões. Foi realizado o mapeamento das categorias de APP ao longo dos cursos d'água, em topos de morros, utilizou-se dados de sensoriamento remoto para a mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, selecionando-se a topografia para a derivação da APP ao longo da hidrografia pelo indicador drenagem e lagos mapeados, e em topos de morros sendo o fator essencial do estudo. Em um cenário da implantação de APP ao longo das áreas de pastagem, considerando que são proporcionalmente responsável pelo dimensionamento do rebanho e, assim, constatou que quase 190 mil ha de pastagens estariam em áreas de topos de morros, pouco mais de 5% das áreas de pastagens, e adicionalmente a APP em hidrografia totalizou 357 mil hectares, ou seja, 9,84% das pastagens sofreriam retração no atendimento à legislação vigente.

**Palavras-chave:** Áreas de Preservação Permanente, mapeamento, produção leiteira, pastagem

**Abstract:** This study aimed to create a scenario mapping Permanent Preservation Areas (APP) to regions of the Triangulo Mineiro and Alto Paranaíba, noting in detail the APP and establish the impact of the implementation of PPAs on the area of pastures and subsequently, milk production, thus analyzing grazing areas as a major factor in the production chain in these regions. It was the mapping of APP's categorias along watercourses, on the tops of hills, we used remote sensing data for the regions of Triângulo Mineiro and Alto Paranaíba, selecting the topography for the derivation of the APP over hydrography of the indicator lakes drainage and mapped, and hilltops are the essential factor in the study. In a scenario of deployment of APP along the grazing areas, because they are proportionately responsible for the design of the herd and thus found that quase 190 hectares of pasture were in areas of hilltops, just over 5% of areas pastures, and in addition to APP hydrography totaled 357,000 hectares, or 9.84% of pastures suffer shrinkage in compliance with current legislation.

**Keywords:** Area of Permanent Preservation, mapping, dairy production, pasture

### **Introdução**

Para realizar um estudo sobre Áreas de Preservação Permanente (APP) é preciso se lembrar da legislação ambiental e destacar a importância de seu mapeamento, pois a legislação brasileira passou a implementar mecanismos legais com relação às mesmas, ao identificar que essas áreas, cobertas ou não por vegetação nativa, detinham a função de preservar os recursos hídricos, a paisagem, a estabilidade geológica, a biodiversidade, o

fluxo de genes da fauna e da flora, proteger o solo e assegurar o bem estar da população humana. (BORGES, et al. 2011).

Em razão das grandes dimensões do território nacional e de suas divisões político-administrativas, sejam micro ou mesorregiões, o trabalho de reconhecimento ou levantamento de campo para mapear os recursos naturais se torna extremamente árduo. A partir das ferramentas computacionais, satelitárias, orbitais e suborbitais e aéreas foi possível acelerar a obtenção de informações cartográficas a respeito da cobertura terrestre, e com isso facilitar os mais diversos tipos de análises, aplicadas às várias áreas do conhecimento.

## **Material e Métodos**

Num exercício para realizar a estimativa de APP versus pastagens, sejam elas degradadas, naturais ou manejadas, utilizou-se dados de sensoriamento remoto para a mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba, selecionando-se a topografia para a derivação da APP ao longo da hidrografia pelo indicador drenagem e lagos mapeados, e em topos de morros.

Para a extração das informações topográficas e morfométricas referentes aos topos de morros e drenagem foi utilizado mosaico SRTM (*Shuttle Radar Topography Mission*) e procedimentos de modelagem de terreno e hidrológica, resultando em uma boa base cartográfica de hidrologia da região, já que não há disponível nenhuma base que atendesse à escala de trabalho.

Para o mapeamento das pastagens, foi utilizada a imagem do satélite Terra cujo sensor Modis detecta a reflectância em várias faixas do espectro eletromagnético, gerando o produto MOD13Q1, de onde se extraiu a banda do NDVI, para a determinação de um intervalo empírico, observado nas imagens de alta resolução disponíveis em base na internet. Foram utilizados resultados de pesquisas de mapeamento para cana-de-açúcar, pastagens e interpretação de fragmentos de florestas para consistir o mapa expedito de pastagens. Assim, a partir da geração dos mapas e obtenção dos dados de áreas de APP e pastagem, pôde-se tabular os dados e analisar a retração das pastagens frente à implantação da APP segundo o Código Florestal e resolução do Conama.

## **Resultados e Discussão**

O trabalho considerou a pastagem como principal fator de dimensionamento do rebanho, sendo assim da produção leiteira, outros fatores podem ser utilizados para uma análise mais completa da cadeia leiteira da região, contudo, os resultados apresentados nos mapas permitiram a distribuição geográfica das áreas de APP e pastagem.

De forma binária os resultados em termos de uso da terra foram divididos entre pastagem e os outros usos e coberturas das terras, denominados de "outros" na apresentação tabular dos resultados frente à APP.

Cerca de 900 mil hectares de Área de Preservação Permanente foram mapeados na mesorregião do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba. Dos 448 mil hectares de APP em drenagem, 4,66% se sobrepõem às pastagens identificadas, as quais totalizaram mais de 3,5 milhões de hectares (Figura 1). A APP em topos de morros ou montanhas se distribuiu predominantemente na região do Alto Paranaíba por apresentar um relevo mais acidentado (Figura 2). Quase 190 mil hectares de pastagens estariam em áreas de topos de morros, pouco mais de 5% das áreas de pastagens, e adicionalmente a APP em hidrografia totalizou 357 mil hectares, ou seja, 9,84% das pastagens sofreriam retração no atendimento à legislação vigente. (Tabelas 1 e 2).

Foram dispostos na Tabela 3 os municípios que apresentaram área de retração superior a 10 mil hectares, ordenados de forma decrescente.



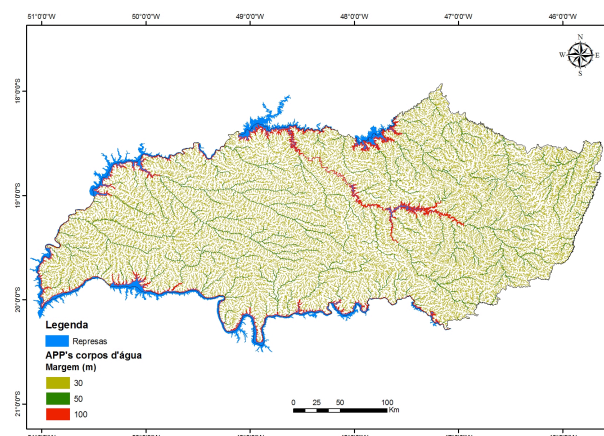


Figura 1. APP em hidrografia, estimada a partir da drenagem e represas identificadas.

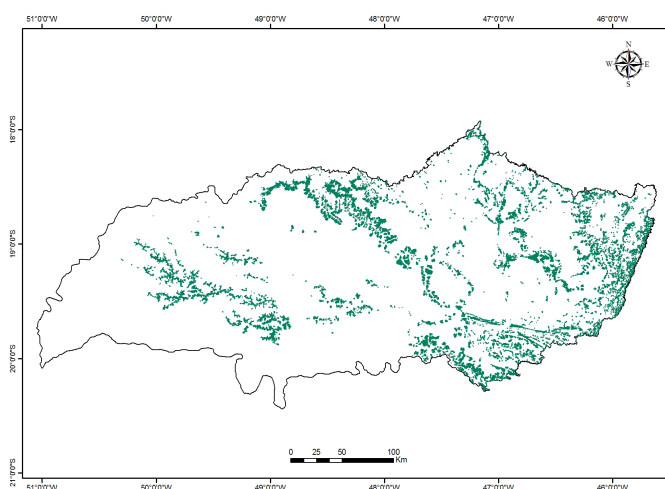


Figura 2. APP em topos de morros e montanhas para a mesorregião.

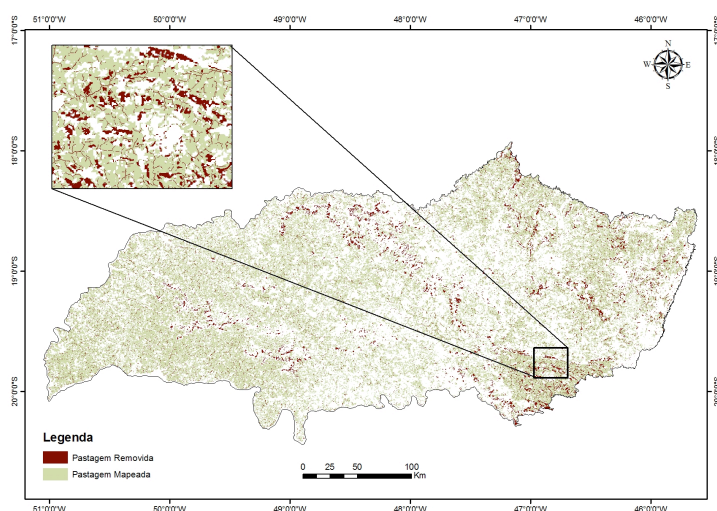
Tabela 1. Distribuição das categorias de APP na pastagem e mesorregião.

Uso da terra	APP				
	Drenagem (ha)	Topo morro (ha)	APP total (ha)	Área útil (ha)	Total (ha)
Pastagem	169.282	188.193	357.475	3.273.979	3.631.454
Outros	279.450	334.595	614.045	4.831.413	5.445.458
<b>Total Triângulo/Alto Par.</b>	<b>448.732</b>	<b>522.788</b>	<b>971.520</b>	<b>8.105.392</b>	<b>9.076.912</b>

Tabela 2. Cenário percentual de ocupação das pastagens pela APP.

Uso da terra	APP				
	Drenagem (%)	Todo de morro (%)	APP total (%)	Área útil (%)	Total (%)
Pastagem	4,66	5,18	9,84	90,16	100
Outros	5,13	6,14	11,28	88,72	100
<b>Total Triângulo/Alto Par.</b>	<b>4,94</b>	<b>5,76</b>	<b>10,7</b>	<b>89,3</b>	<b>100</b>

Na Figura 3, o mapa de pastagens totais obtidos por meio dos índices de vegetação calculados através do sensor Modis, com pixels de 250 m, equivalente à escala cartográfica de 1:1.000.000, e apresentando em tom vermelho escuro as áreas de sobreposição ou retração.



**Figura 3.** Áreas de pastagens mapeadas e eventuais áreas de retração, as quais seriam removidas num cenário de implantação de APP.

**Tabela 3.** Ranking decrescente das maiores áreas de retração de pastagens por município.

Municípios	Pastagem mapeada (ha)	Retração (ha)	Retração (%)
Sacramento	131.902	24.077	18,25
Coromandel	155.442	21.023	13,52
Araguari	70.316	18.444	26,23
Campina Verde	202.897	16.699	8,23
Tapira	84.655	16.639	19,66
Uberlândia	157.008	13.441	8,56
Patos de Minas	130.872	13.341	10,19
Ibiá	108.431	11.713	10,80
Tiros	89.331	11.631	13,02
Tupaciguara	59.387	11.458	19,29
Patrocínio	82.167	11.066	13,47
Prata	197.855	10.357	5,23

## Conclusões

Num cenário determinístico de implantação de APP em que as áreas de pastagem são proporcionalmente responsáveis pelo dimensionamento do rebanho e, por conseguinte, pela produção de leite na pecuária extensiva ou a pasto, a despeito de inúmeros outros fatores, haveria um impacto de aproximadamente 10% para a mesorregião em questão.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig pelo apoio a esta pesquisa.

À Sectes – Secretaria de Ciência, Tecnologia e Educação Superior do Estado de Minas Gerais pelo suporte financeiro.

Ao Pólo de Excelência do Leite e Derivados pelo apoio a esta pesquisa.

À Embrapa Gado de Leite pelo apoio ao trabalho.

### **Literatura Citada**

BORGES, L. A. C; REZENDE, J. L. P; PEREIRA, J. A. A; COELHO JUNIOR, L. M; BARROS, D. A. Áreas de preservação permanente na legislação ambiental brasileira. **Ciência Rural**, v.41, n.7, 2011.

COSTA, T. C. C; SOUZA, M. G; BRITES, R. S. Delimitação e caracterização de áreas de preservação permanente, por meio de um sistema de informações geográficas. In: Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, 8., 1996, Natal. **Anais...** Natal, 1996. p. 121–127.

JENSEN, J. R. **Sensoriamento remoto do ambiente: uma perspectiva em recursos terrestres**. São José dos Campos: Parêntese, 2009. 598 p.

# A captação de leite fluido em 2011

## Milk delivery in 2011

Daniel Auad Gama<sup>1</sup>, Kennya Beatriz Siqueira<sup>2</sup>, Bruna Rodrigues Nascimento<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Ciências Econômicas da UFJF. e-mail: e-ncal@cnppl.embrapa.br

<sup>2</sup>Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite. e-mail: kennya@cnppl.embrapa.br

<sup>3</sup>Estudante de Ciências Econômicas da UFJF. e-mail: e-ncal2@cnppl.embrapa.br

**Resumo:** O comportamento da produção mundial de leite é influenciado por diversos fatores, sejam eles macroeconômicos, setoriais, ou até mesmo climáticos. Com o intuito de acompanhar de perto a evolução da produção ao longo do ano, a captação de leite fluido foi utilizada como variável *proxy*. Através de fontes secundárias, foi feita uma análise do comportamento da captação em 2011, com foco em algumas das maiores variações do ano. Na Argentina, onde foi observada uma variação positiva de 13,5%, as boas condições climáticas, juntamente com o consumo doméstico, o preço internacional do leite em pó e o ciclo de investimentos no setor, contribuíram para o incremento da captação. No caso do Chile, houve também incremento na captação e este pode ser devido, em parte, à inclusão dos dados de três novas plantas de processamento de lácteos nas estatísticas nacionais. Já no Brasil, foi registrada redução de 2,2% no índice de captação, com redução em praticamente todos os estados. Na captação mundial de leite fluido, houve um acréscimo de 2,6%, retomando a taxa de crescimento dos últimos dez anos, após o fraco desempenho de 2009.

**Palavras-chave:** captação, produção, setor lácteo

**Abstract:** The world milk production is influenced by several factors, as macroeconomic variables, sectorial factors or weather conditions. In order to follow the evolution of the milk production during the year, the milk delivery is used as a proxy variable. Using secondary sources, we analyzed the milk delivery in 2011, focusing on the biggest changes of the year. In Argentina the milk delivery variation was 13.5%. It was caused by the good weather conditions, together with domestic consumption improvements, a good international price for milk powder and the investments in the sector. In Chile, milk delivery increased because three new plants were included in the national statistics. In Brazil, the milk delivery index decreased 2.2%, with reduction in almost all the states. In the world milk delivery, there was an increase of 2.6%, recovering the growth rate of the last ten years, after the weak performance in 2009.

**Keywords:** milk delivery, production, dairy sector.

## Introdução

Em 2010, a produção mundial de leite de vaca foi de aproximadamente 599 milhões de toneladas, sendo 64% desse volume produzido na América ou na Europa (FAO, 2012). O comportamento da produção está ligado a diversos fatores, sejam eles macroeconômicos, setoriais, ou até mesmo climáticos. Com o intuito de acompanhar a evolução da produção ao longo do ano de 2011, utilizou-se a captação de leite fluido como variável *proxy*.

O comportamento da captação de leite fornece informações importantes sobre as mudanças ocorridas no processo produtivo, assim como no contexto econômico. Nesse sentido, é divulgado, mensalmente, pelo Centro de Inteligência do Leite (CILEite), o indicador de captação de leite fluido para 32 países.

Tendo em vista a relevância em acompanhar o comportamento da captação, este trabalho tem por objetivo fornecer uma análise de seu desempenho em 2011, a nível mundial e em países selecionados, a fim de identificar os fatores que contribuíram para o incremento da produção.

## Material e Métodos

Foram utilizadas fontes secundárias para o levantamento de dados. A partir das informações coletadas, foi feita uma análise da evolução da captação de leite fluido no mundo e em países selecionados. As variações anuais foram calculadas com base na variação do total acumulado no ano em relação ao mesmo período do ano anterior, ou seja:

$$\left( \frac{\sum_{i=1}^{12} X_{i,2011}}{\sum_{i=1}^{12} X_{i,2010}} - 1 \right) * 100 \quad (1)$$

em que:  $X$  indica a captação de leite em determinado país; e  $i$  refere-se ao mês.

## Resultados e Discussão

Pelo cálculo da variação anual do volume de leite captado em 2011 em relação a 2010, observa-se que tanto países da América do Sul quanto da União Europeia se destacaram, como mostra a Tabela 1.

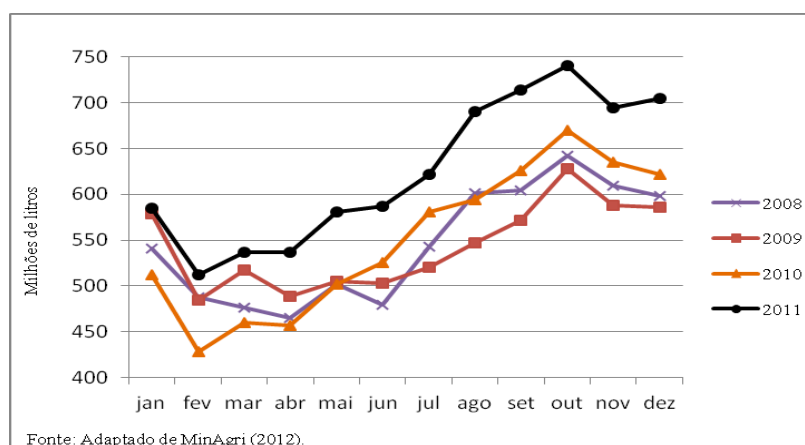
**Tabela 1.** Maiores variações, positivas e negativas, da captação de leite fluido em 2011.

País	Variação (%)
Argentina	13,5
Chile	11,0
Letônia	5,9
França	5,5
Bulgária	-7,5
Grécia	-7,2
Brasil	-2,2
Hungria	-2,1

Fonte: Resultados da pesquisa.

Na América do Sul, Argentina e Chile sobressaíram com os maiores incrementos na captação, enquanto o Brasil apresentou pequeno decréscimo na captação de 2011, em relação ao ano de 2010. O mesmo comportamento heterogêneo pôde ser observado na UE, onde a Letônia e a França despontam com os maiores incrementos na captação de leite, ao passo que Bulgária, Grécia e Hungria destacam-se por recuos na oferta de leite.

Na Figura 1 é mostrada a evolução mensal da captação de leite fluido na Argentina no período de 2008 a 2011. Os dados referentes a 2011 mostram uma mudança de nível, apresentando um volume de captação bem acima do patamar verificado para os três anos anteriores.



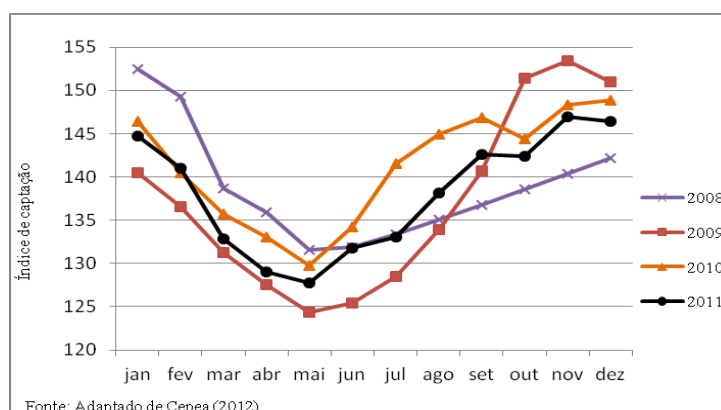
**Figura 1.** Evolução da captação de leite fluido na Argentina, em milhões de litros.

Na Argentina, o volume de leite captado chegou ao pico em outubro e, apesar da forte queda em novembro, fechou o ano com 7,5 bilhões de litros adquiridos pelas indústrias de laticínios. No acumulado do ano, a captação de leite fluido da Argentina mostrou um crescimento de 13,5%. As boas condições climáticas, juntamente com o aumento do consumo doméstico, ajudam a explicar o bom resultado obtido pelo setor lácteo argentino no primeiro semestre do ano. Há de se destacar também a concretização de um importante ciclo de investimentos realizados por empresários do setor, tendo como resultado o aumento da eficiência do sistema de produção. Já para 2012, espera-se que o setor leiteiro da Argentina invista aproximadamente 52 milhões de dólares em infraestrutura (MILKPOINT, 2012).

Além disso, os preços internacionais parecem estar influenciando o aumento da produção argentina. De acordo com Milkpoint (2012), a manutenção do preço internacional de leite em pó entre US\$ 3.500,00 e US\$ 4.000,00 seria o limite para que a atividade leiteira e a exportação de lácteos sejam rentáveis na Argentina. Analisando os preços internacionais, pode-se observar que o valor do leite em pó integral do Leilão da Fonterra chegou a US\$ 4.619,00 em março de 2011, o que torna viável as exportações argentinas e ajuda a explicar o incremento na captação de leite. No entanto, em agosto, o preço chegou ao patamar de US\$ 3.383,00, abaixo do nível considerado rentável. Mas, em outubro, a cotação já atingiu os US\$ 3.503,00 (MILKPOINT, 2012), estimulando, novamente, os produtores da Argentina.

Além da Argentina, outros países também mostraram um volume captado bem acima dos anos anteriores, como é o caso do Chile. Segundo dados publicados pela Odepa (2012), o volume de leite captado no Chile apresentou uma variação de 11,0% no acumulado do ano. No entanto, vale ressaltar que, a partir de março de 2011, as estatísticas da Odepa passaram a incluir dados de três novas plantas processadoras de produtos lácteos, o que pode explicar, em parte, a elevação do volume captado. Estas novas plantas processam principalmente queijos, o que levou a um aumento na produção de queijos de 24,9% em 2011, ao passo que entre 2009 e 2010 o incremento foi de 12,7%. Com relação ao processamento dos demais derivados lácteos, leite em pó e iogurte avançaram 12,7% e 11,7%, respectivamente.

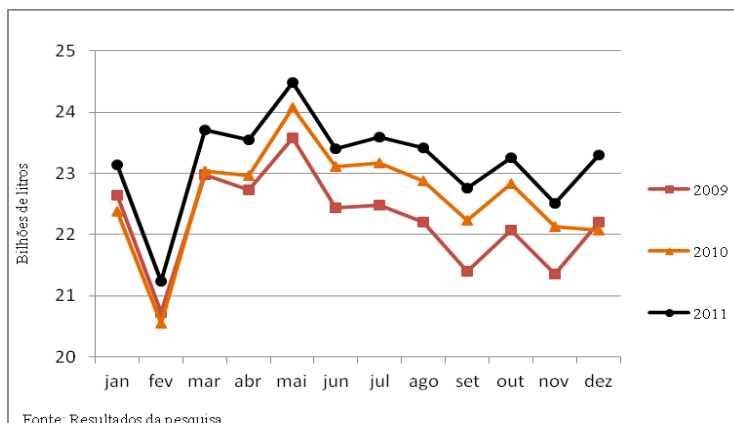
No caso do Brasil, de acordo com o índice de captação do Cepea (2012), o volume de leite fluido captado no País teve decréscimo de 2,2% em 2011. Dentre os estados considerados na elaboração do índice, vale ressaltar o decréscimo de 14% em Goiás, devido principalmente à forte competição existente entre a atividade pecuária e a cana-de-açúcar em algumas regiões do estado. Já no Rio Grande do Sul, a redução se deve, principalmente, a fatores climáticos (CEPEA, 2012). A Figura 2 a seguir descreve a evolução do índice de captação de leite fluido no Brasil, de janeiro de 2008 a dezembro de 2011.



**Figura 2.** Evolução da captação de leite fluido no Brasil.

Com relação à captação mundial de leite fluido, considerando os 32 países analisados pelo CILeite, os quais responderam por 50% da produção mundial em 2010, o volume captado em 2011 apresentou um crescimento de 2,6%. Se confirmada esta variação, a taxa de crescimento retomaria a média dos últimos dez anos, após o fraco

desempenho de 2009. A Figura 3 a seguir descreve a evolução mensal do volume de leite fluido captado nos 32 países em questão, a partir de janeiro de 2009.



**Figura 3.** Evolução mensal da captação de leite fluido em 32 países, em bilhões de litros.

### Conclusões

A evolução da captação de leite fluido ao longo do ano fornece informações importantes sobre as mudanças ocorridas no processo produtivo, assim como no contexto econômico, o que torna relevante o monitoramento desta variável, a fim de identificar fatores relevantes para a produção. Na Argentina, a captação tem sido incentivada pela manutenção do preço internacional do leite em pó em níveis rentáveis, assim como por fatores climáticos e pelo aumento da demanda interna. Soma-se ainda a estes fatores a conclusão de importantes investimentos no setor. No caso do Chile, o incremento na captação se deve, em parte, à inclusão dos dados de três novas plantas nas estatísticas da Odepa. No Brasil, com decréscimo de 2,2% em 2011, houve redução em praticamente todos os estados, com destaque para Goiás, devido à competição da pecuária leiteira com outras atividades, como a cana-de-açúcar. A captação mundial de leite fluido teve um acréscimo de 2,6%, retomando a taxa de crescimento dos últimos dez anos, após o fraco desempenho de 2009.

### Agradecimentos

A Fapemig, ao CNPq pelo apoio à pesquisa.

### Literatura citada

CEPEA – Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada. Disponível em: <<http://cepea.esalq.usp.br/>>. Acesso em: 01 mar. 2012.

CILEITE – Centro de Inteligência do Leite. Disponível em: <<http://cileite.com.br>>. Acesso em: 05 mar. 2012.

FAO - Food And Agriculture Organization Of The United Nations. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 09 mar. 2012.

MILKPOINT. Disponível em: <<http://milkpoint.com.br>>. Acesso em: 08 mar. 2012.

MINAGRI – Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Disponível em: <<http://minagri.gob.ar/>>. Acesso em: 06 mar. 2012.

ODEPA – Oficina de Estudios y Políticas Agrarias. Disponível em: <<http://odepa.gob.cl/>>. Acesso em: 07 mar. 2012.

# Cenário de exportação e importação de lácteos do Brasil e do Mundo

## Scenario of dairy export and import of the Brazil and World

Maryá Cristina Rabelo<sup>1</sup>, Kennya Beatriz Siqueira<sup>2</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>2</sup>, Letícia d'Agosto Fonseca<sup>1</sup>, Daniel Auad Gama<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Estagiário(a) da Embrapa Gado de Leite – Estudante do curso de Geografia da UFJF, Juiz de Fora/Minas Gerais

<sup>2</sup>Pesquisador(a) da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora

<sup>3</sup>Estagiário da Embrapa Gado de Leite – Estudante do curso de Ciências Econômicas da UFJF, Juiz de Fora/Minas Gerais

**Resumo:** O presente trabalho teve como objetivo estudar as variáveis econômicas, conjunturais e espaciais relacionadas com o comércio de lácteos. Especificamente, o trabalho teve como objetivos elaborar mapas temáticos e obter produção de imagens do fluxo de comércio de lácteos no mundo. O mapeamento de variáveis do comércio internacional de lácteos mostrou-se uma ferramenta de grande valia para análises econômicas. Com auxílio dos mapas foi possível visualizar a regionalização do comércio de lácteos.

**Palavras-chave:** Comércio internacional de lácteos, mercado lácteo brasileiro, geoprocessamento.

**Abstract:** The present work aimed to study the economic, conjectural, and spatial variables, related to dairy trade. Specifically, the study aimed to develop thematic maps and get images of international dairy trade. Mapping the international dairy trade variables was valuable for economic analysis. The maps allow a better visualization of the dairy trade regionalization.

**Keywords:** Dairy international dairy trade, Brazilian dairy market, GIS.

## Introdução

Assim como a atividade leiteira na fazenda, o mercado mundial de lácteos possui características muito peculiares. Dentre estas características destaca-se o reduzido volume de mercadorias transacionadas internacionalmente. Apenas 5-7% da produção mundial de leite é comercializada entre países (LEITE et al., 2009). Além disso, a distância percorrida pelos lácteos tende a ser menor do que a de outras *commodities*, ou seja, grande volume de lácteos é transacionado entre países vizinhos.

No caso do Brasil, apesar de estar entre os maiores produtores de leite do mundo, o País tem se destacado mais na importação do que na exportação de lácteos. E a questão da regionalidade também parece vigorar no comércio de lácteos do Brasil para o mundo.

Diante do exposto, torna-se oportuno avaliar o comércio internacional de lácteos sob a ótica da geografia. Ou seja, através do uso de mapas pretende-se analisar os maiores fluxos de comércio de lácteos com vistas a examinar a distância percorrida pelo leite no mundo. Embora o mapeamento já venha sendo usado em grande proporção em outras áreas da ciência, na economia internacional esta ferramenta ainda é pouco utilizada. No entanto, este tipo de ferramenta permite uma melhor visualização e entendimento das variáveis relativas ao comércio internacional.

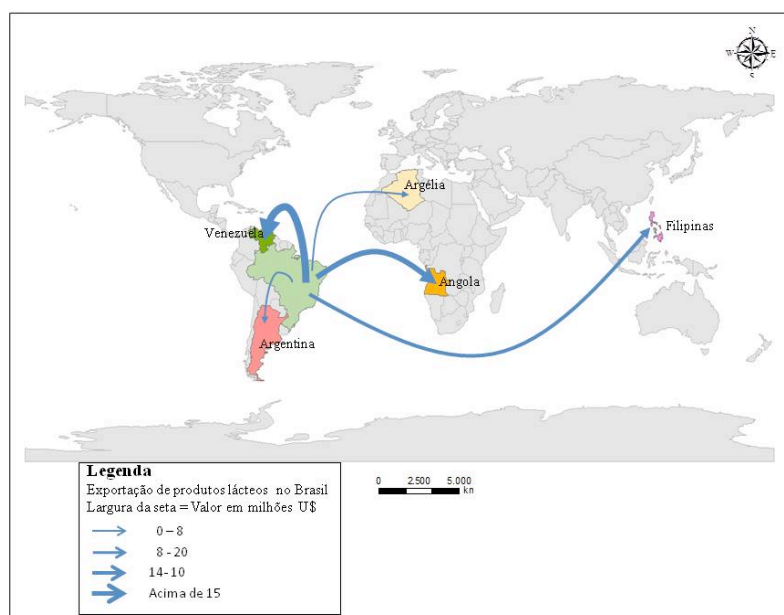


## Material e Métodos

Para a realização do estudo foram coletados dados de exportação e importação de lácteos e feito o mapeamento dos maiores fluxos de comércio de lácteos no mundo e no Brasil. Os dados do mundo foram coletados no Comtrade (2012) e referem-se ao ano de 2009. Os dados do Brasil foram retirados do MDIC (2012) e são referentes ao ano de 2010. Os produtos lácteos considerados na pesquisa são todos aqueles que constam nos códigos SH-04.01.00 a SH-04.06.99. Vale ressaltar que a nomenclatura anterior refere-se ao Sistema Harmonizado (SH) que é adotado para classificação das mercadorias e serviços comercializados entre países. Para o mapeamento das variáveis pesquisadas foi empregado o *software* ArcGIS 9.3.

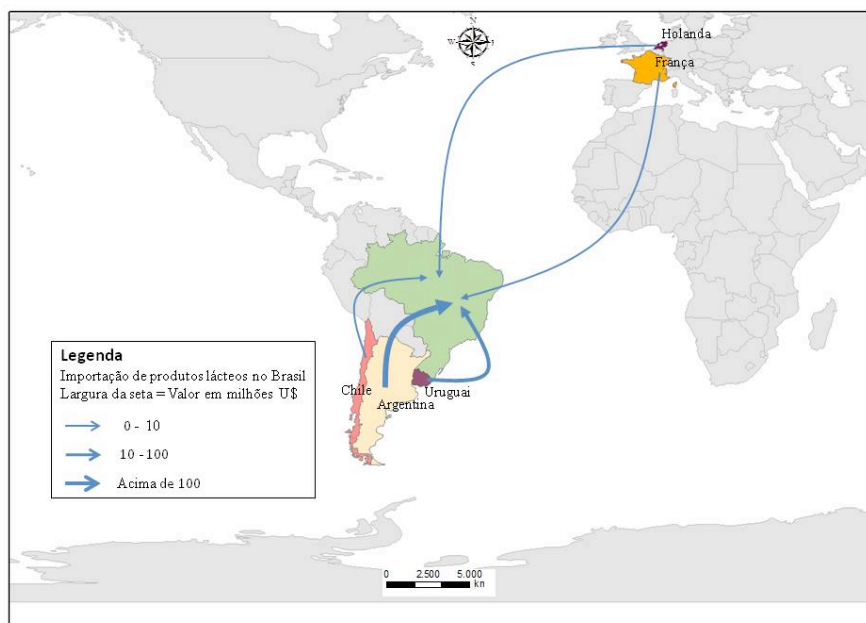
## Resultados e Discussão

De acordo com o estudo realizado, no comércio internacional de produtos lácteos em 2010 observou-se que o Brasil exportou mais lácteos para a Venezuela (US\$ 32.081.962), seguida por Angola (US\$ 14.438.404), Filipinas (US\$ 10.482.600), Argélia (US\$ 8.663.118) e Argentina (US\$ 8.203.401). Do lado da importação, o Brasil importou mais produtos lácteos da Argentina (US\$ 194.262.940), Uruguai (US\$ 91.139.763), Chile (US\$ 9.607.797), França (US\$ 9.584.266) e Holanda (US\$ 9.496.501). Com exceção das Filipinas, os demais países que receberam produtos lácteos do Brasil em maior escala destacam-se pela proximidade com o País. As Figuras 1 e 2 apresentam o fluxo de comércio de leite e derivados do Brasil.



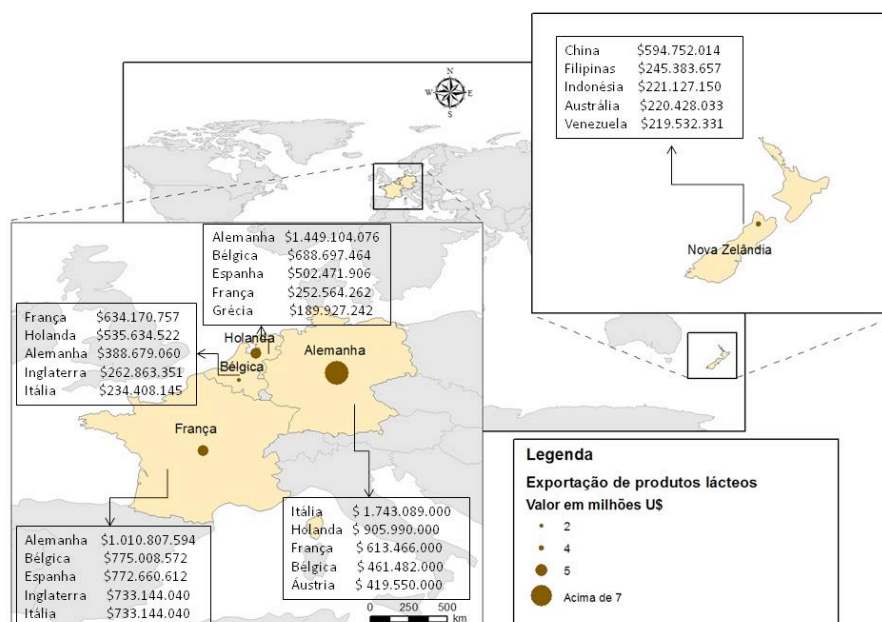
**Figura 1.** Exportação de lácteos do Brasil em 2010.

**Fonte:** MDIC (2012). Elaboração: os autores.



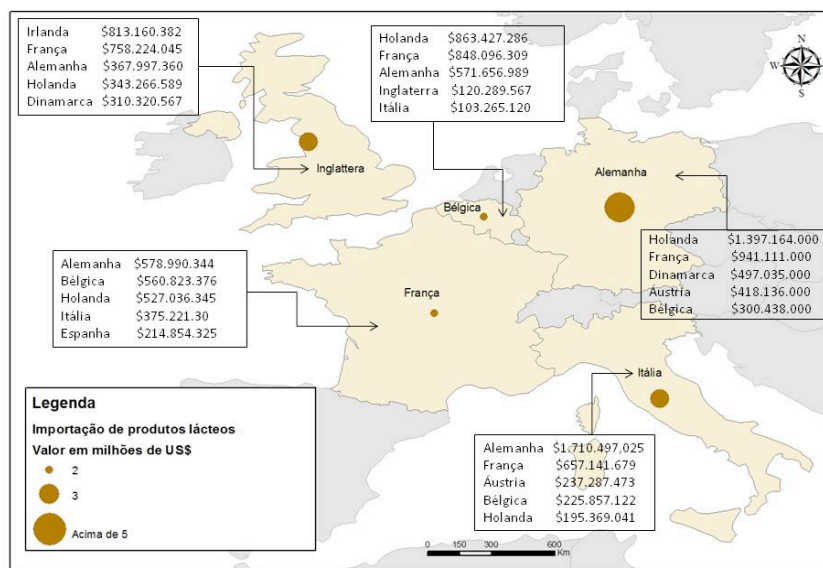
**Figura 2.** Importação de lácteos do Brasil em 2010.  
**Fonte:** MDIC (2012). Elaboração: os autores.

Em relação aos países que mais exportaram produtos lácteos no mundo em 2009, destaca-se a Alemanha com um total de US\$ 7.105.340.000. Em sequência tem-se a França com US\$ 5.876.444.751, Holanda com US\$ 5.165.978.855, Nova Zelândia com US\$ 4.684.517.044 e Bélgica com US\$ 2.813.885.313. Pela Figura 2 pode-se perceber que o Brasil tem importado mais produtos de países da América do Sul. Na Figura 3 são apresentadas as exportações de lácteos em 2009.



**Figura 3.** Principais países exportadores de lácteos em 2009.  
**Fonte:** Comtrade (2012). Elaboração: os autores.

De acordo com o estudo realizado, os países que mais importaram produtos lácteos no mundo em 2009 foram Alemanha (US\$ 5.265.792.000), Itália (US\$ 3.766.296.493), Inglaterra (US\$ 3.089.854.585), França (US\$ 2.860.962.040) e Bélgica (US\$ 2.786.706.576) como é mostrado na Figura 4.



**Figura 4.** Principais países importadores de lácteos em 2009.

**Fonte:** Comtrade (2012). **Elaboração:** os autores.

Nas Figuras 3 e 4, a questão da regionalidade do comércio de lácteos fica nítida. Nestas figuras, pode-se observar que os países da União Europeia destacam-se tanto como os maiores compradores quanto como os maiores exportadores de lácteos. Ou seja, o fluxo de lácteos nesta região é intenso. Isso deve-se tanto ao reduzido tamanho dos países e à proximidade entre eles quanto à isenção de tarifas dentro da zona do euro.

## Conclusões

O mapeamento de variáveis do comércio internacional de lácteos mostrou-se uma ferramenta de grande valia para análises econômicas. Com auxílio dos mapas foi possível, visualizar a regionalização do comércio de lácteos, especialmente entre os países da União Europeia. Esta regionalização pode ser fruto de vários fatores como: acordos de comércio, reduzida vida de prateleira de alguns derivados lácteos, elevado custo de transporte de alguns produtos (especialmente aqueles que exigem refrigeração), perecibilidade de alguns derivados, etc.

## Agradecimentos

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig pelo apoio a esta pesquisa.

À Embrapa Gado de Leite pelo apoio ao trabalho.

## Literatura Citada

COMTRADE - United Nations Commodity Trade Statistics Database: Statistic Division. Commodity Trade Division. United Nations, New York, 2010. Disponível em: <<http://comtrade.un.org>>. Acesso em: 20 fev. 2012.

LEITE, J. L. B.; CARVALHO, G. R. O comércio mundial de lácteos e a participação brasileira. In: LEITE, J. L. B. et al. (Ed.). **Comércio Internacional de Lácteos**. 2. ed. rev. e ampl. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009.

MDIC – Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio. Disponível em: <[www.mdic.gov.br](http://www.mdic.gov.br)>. Acesso em: 10 nov. 2009.

## **Análise espacial de indicadores de qualidade do leite**

Andrea Freguglia Bruno<sup>1</sup>, Raíssa Salomão Ozório, Samuel Miguel Hylario, Marília Hauck da Encarnação, Gilvânia Lúcia Oliveira de Carvalho<sup>2</sup>, Célia Regina Grego<sup>3</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>4</sup>, Márcio Roberto Silva<sup>4</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Iniciação Científica CNPq – Embrapa Gado de Leite. Graduanda em Medicina Veterinária, Unipac – JF. E-mail: andreamais@gmail.com

Bolsista de Iniciação Científica – Embrapa Gado de Leite. Graduanda em Medicina Veterinária, Unipac – JF. E-mail: rah\_ozorio@hotmail.com

Bolsista de Iniciação Científica Fapemig – Embrapa Gado de Leite. Graduando em Medicina Veterinária, Unipac – JF. E-mail: hylariosamuel@hotmail.com

Estagiária Embrapa Gado de Leite - Graduanda em Medicina Veterinária, Unipac – JF. E-mail: mariliahet@gmail.com

<sup>2</sup>Médica Veterinária - Emater Rondônia, Mestranda em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivados da UFJF/ILCT/Embrapa Gado de Leite. E-mail: gilvania@emater-ro.com.br

<sup>3</sup>Pesquisadora da Embrapa Monitoramento por Satélite. E-mail: cregrego@cnpm.embrapa.br

<sup>4</sup>Engenheiro Florestal, M.S.c. Ciência Florestal, Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. E-mail: marcos.hott@embrapa.br

Médico Veterinário, Doutor em Saúde Pública, Área de Concentração (Epidemiologia), Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. E-mail: marcio-roberto.silva@embrapa.br

Médico Veterinário, Doutor em Ciência Animal, Área de Concentração (Epidemiologia) Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. E-mail: guilherme.souza@embrapa.br

**Resumo:** O presente estudo procura avaliar os indicadores de qualidade do leite do ponto de vista espacial. Para tal foram utilizadas informações sobre as coordenadas geográficas de 217 rebanhos localizados na Microrregião de Ji-Paraná, Rondônia, e resultados de análises de amostras de leite destes rebanhos para determinação dos componentes (gordura, proteína, lactose e estrato seco desengordurado), contagem de células somáticas (CCS) e contagem total de bactérias (CTB). As análises foram realizadas no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite em equipamentos automatizados. Foi observada dependência espacial para gordura, lactose, estrato seco desengordurado, CCS e CTB na região estudada. Entretanto, não foi verificada dependência espacial para proteína. A dependência espacial foi fraca para gordura e estrato seco desengordurado e moderada para lactose, CCS e CTB. Sugere-se que com o aumento do número de rebanhos analisados dentro da área aumentará a dependência espacial para os indicadores de qualidade do leite avaliados. A análise espacial dos indicadores de qualidade do leite mostrou-se uma ferramenta capaz de fornecer informações para auxiliar o setor público e privado na tomada de decisão em relação a definição ações direcionadas para áreas com características semelhantes.

**Palavras-chave:** indicators of milk quality, spatial analysis, decision-making.

**Abstract:** This study evaluates the feasibility of spatial analysis for indicators of milk quality. We used information on the geographical coordinates of two hundred seventeen flocks located in the micro region of Ji-Paraná, Rondônia and results of analyzes of samples of milk from these herds to determine the components (fat, protein, lactose and nonfat dry strata) somatic cell count (SCC) and total count of bacteria (TCB). The analyzes were performed at the Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite in automated equipment. Was observed spatial dependence for fat, lactose, nonfat dry stratum, SCC and TCB in the region studied. However, there was no spatial dependence for protein. The spatial dependence was weak for fat and nonfat dry stratum and moderate lactose, SCC and TCB. It's suggested that by increasing the number of herds studied in the area will increase the spatial dependence of the quality indicators measured milk.

## **Introdução**

Quando se analisam as perspectivas do agronegócio do leite no Brasil, seus desafios e cenários futuros, a melhoria dos indicadores de qualidade do leite é sempre citada como um dos principais desafios para as diferentes regiões. Os indicadores de qualidade podem ser classificados como de qualidade composicional, representado basicamente pela gordura, proteína e lactose, e de qualidade higiênico-sanitários, representados pela contagem de células somáticas (CCS) e contagem total de bactérias (CTB). Entretanto, é escassa a utilização de ferramentas que avaliam a variação dos indicadores de qualidade do leite no espaço entre microrregiões, mesorregiões, estados e regiões no Brasil. Os atributos geográficos relacionados à localização dos rebanhos e seus indicadores de qualidade do leite podem ser explorados em termos geoestatísticos para análise e identificação de áreas (territórios) com características espaciais semelhantes. Estas características são expressas em mapas temáticos digitais gerados a partir de tabelas relacionais construídas em Sistema de Informações Geográficas (SIG) comercial, dotado de sistema de gerenciamento de banco de dados capaz de processar grande volume de dados vetoriais ou matriciais. Análises espaciais podem gerar informações importantes na tomada de decisão tanto pelo setor público como pelo setor privado. O objetivo do presente estudo foi avaliar espacialmente os indicadores de qualidade do leite.

## **Material e Métodos**

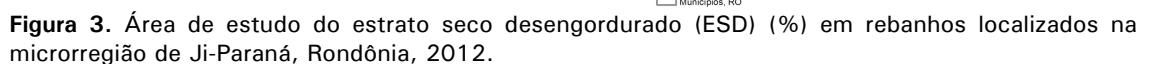
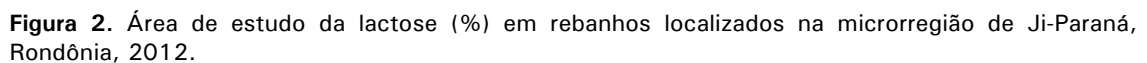
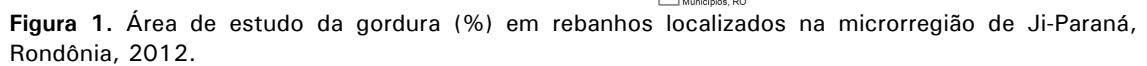
### **Metodologia**

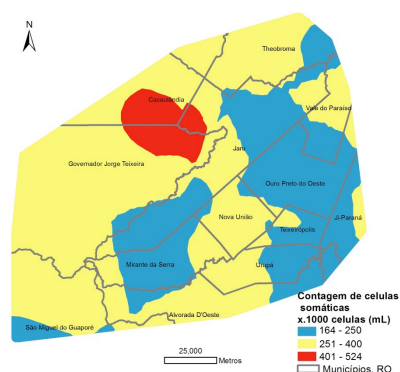
O trabalho foi desenvolvido com informações sobre as coordenadas geográficas e indicadores de qualidade do leite de rebanhos localizados na região central do estado de Rondônia. A área de estudo foram as bacias leiteiras de Ji-Paraná e Jarú, ambas localizadas na microrregião de Ji-Paraná, compreendendo 11 municípios (Governador Jorge Teixeira, Jarú, Theobroma, Vale do Paraíso, Ouro Preto D'Oeste, Nova União, Mirante da Serra, Teixeirópolis, Urupá, Ji-Paraná e Presidente Médici) em uma área de 25.088,40 Km<sup>2</sup> e com aproximadamente 217 rebanhos. Nesta área, foram escolhidos aleatoriamente entre os municípios 250 rebanhos para obtenção das coordenadas geográficas e amostras de leite de rebanhos para realização de análises laboratoriais com objetivo de avaliar os indicadores de qualidade do leite. A determinação dos componentes do leite, CCS e CTB foram realizadas em equipamentos automatizados no Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite. O método utilizada para a determinação dos componentes foi o de absorção do infravermelho médio e para a CCS e CTB o de citometria de fluxo (1, 2, 3). A coleta, armazenamento e transporte de amostras foram realizadas de acordo com normas internacionais (BRITO et al., Citar circular técnica 92). Para verificar a dependência espacial dos indicadores de qualidade do leite, interpolar dados e elaborar os mapas, foi empregada a análise geoestatística segundo Vieira (2000).

## **Resultados e Discussão**

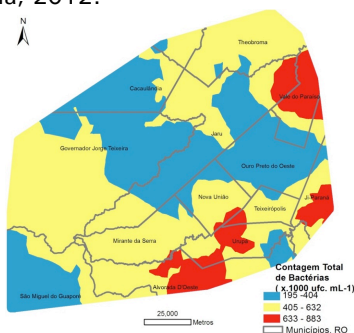
Os resultados mostraram que houve dependência espacial para a gordura, lactose, estrato seco desengordurado (ESD), CCS e CTB. Foi observada uma dependência espacial fraca (grau de dependência entre 1 e 25) para gordura e ESD. Entretanto, foi identificada uma dependência espacial moderada (grau de dependência entre 26 e 75) para lactose, CCS e CTB. No que diz respeito à distribuição espacial dos indicadores de qualidade composicional, foi observado que os maiores teores de gordura estavam localizados na região noroeste da Microrregião estudada (Figura 1). Os maiores teores de lactose foram identificados na região relativa à bacia leiteira de Jarú (Figura 2). Para o ESD, refletido pela soma da lactose e gordura, as áreas com maior teores estão difundidas na região noroeste, sudeste e nordeste (Figura 3). Foi também identificada uma interação espacial entre a CCS com a lactose e ESD, com dependência espacial moderada. Esta interação é relativa ao impacto negativo da CCS sobre os indicadores de qualidade composicional do leite e esta interação é expressa em forma de mapas. Ao se avaliar o resultado da análise espacial para CCS, foi identificada uma área na bacia leiteira de Jarú com as maiores contagens

No caso das indústrias e cooperativas que realizam o processamento do leite cru em derivados, estes podem utilizar os mapas para a definição de estratégias gerenciais com foco na captação de matéria prima diferenciada para a fabricação de produtos lácteos específicos.





**Figura 4.** Área de estudo da contagem de células somáticas (CCS) em rebanhos localizados na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia, 2012.



**Figura 5.** Área de estudo da contagem total de bactérias (CTB) em rebanhos localizados na microrregião de Ji-Paraná, Rondônia, 2012.

## Conclusões

As informações geradas por meio de mapas de qualidade do leite poderão ser utilizadas na definição de políticas públicas e estratégias gerenciais para as indústrias de laticínios do Brasil.

## Agradecimentos

Embrapa Gado de Leite, Emater Rondonia, CNPq (Edital MCT 14/2010 processo nº 477493/2010-6), Fapemig (Projeto APQ/CVZ 1305/2010).

## Literatura citada

BRITO, J. R. F., SOUZA, G. N., FARIA, C. G., MORAES, L. C. D. **Procedimentos para coleta e envio de amostras de leite para determinação da composição e das contagens de células somáticas e de bactérias.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2007. 8 p. (Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica, 92).

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Milk. Enumeration of somatic cells – Part 2: Guidance on the operation of fluoro-opto-electronic counters.** Brussels: IDF, 2006. 13p. IDF Standard 148-2.

INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **Whole Milk.** Determination of milk fat, protein and lactose content – Guidance on the operation of mid-infrared instruments. Brussels: IDF, 2000. 15p. IDF Standard 141C.

SUHREN, G.; WALTE, H. G. **First experiences with automatic flow cytometric determination of total bacterial count in raw milk.** In: INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. Brussels: IDF, 2000. 54p. IDF Bulletin 358/2000.

# Impacto do dióxido de carbono nos aspectos biológicos de *Chrysoperla externa* (HAGEN, 1861) (Neuroptera: Chrysopidae)

Dayane Ribeiro dos Santos<sup>1</sup>, Alexander Machado Auad<sup>2</sup>, Marcy das Graças Fonseca<sup>3</sup>, Tiago Teixeira Resende<sup>4</sup>, Thiago Henrique dos Santos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Estagiária da Embrapa Gado de Leite, bolsista da Fapemig. E-mail: dayane.rsantos@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup>Pós doutoranda da Embrapa Gado de Leite, bolsista do CNPq

<sup>4</sup>Bolsista de Apoio Técnico do CNPq

<sup>5</sup>Estagiário da Embrapa Gado de Leite, bolsista da Embrapa

**Resumo:** Os crisopídeos são inimigos naturais de afídeos que causam danos às gramíneas forrageiras. Dentro de um contexto de mudanças climáticas globais, e possíveis efeitos sobre os organismos vivos, o objetivo desse trabalho foi verificar se o aumento da concentração do CO<sub>2</sub> influencia os aspectos biológicos de *Chrysoperla externa*. O predador foi mantido em placas de Petri (5 cm de diâmetro) contendo seções foliares de capim-elefante infestadas com o afídeo e mantidos em câmara climática tipo fitotron com CO<sub>2</sub> controlado a 500 ppm ou CO<sub>2</sub> flutuante (média 368 ppm) ou em casa de vegetação (média 440 ppm). A duração e a viabilidade dos ínstar e das fases larval, pupal e pré-imaginal do predador foram avaliadas. Verificou-se menor duração do primeiro e segundo ínstar, período larval e pré-imaginal do predador mantido em ambiente com CO<sub>2</sub> flutuante, comparado aqueles submetidos a níveis de 500 ppm. O ambiente de casa de vegetação proporcionou aumento na duração, em torno de 1,5 vezes, de todos os parâmetros biológicos avaliados, comparado com os insetos mantidos em ambientes com CO<sub>2</sub> controlado ou flutuante. Não foi constatada diferença significativa na sobrevivência dos predadores mantidos em câmara climática à 500ppm ou CO<sub>2</sub> flutuante. Porém, nesses ambientes, verificou-se maior sobrevivência no terceiro ínstar, fase larval e pré-imaginal, comparado com aqueles mantidos em casa de vegetação. Na câmara climática, o aumento da concentração do CO<sub>2</sub> atmosférico retardou o desenvolvimento de *C. externa*; no entanto, a sobrevivência não foi alterada, sugerindo que ele pode ser utilizado como inimigo natural, nessas condições.

**Palavras-chave:** Afídeos, controle biológico, mudanças climáticas, predador.

**Abstract:** The lacewings are natural enemies of aphids that cause damage to forage grasses. As climatic change raise the possibility of interference on living organisms, this study aimed at verifying whether a higher concentration of CO<sub>2</sub> would influence the biological aspects of *Chrysoperla externa*. The duration and viability of instars and larval, pupal and pre-imaginal phases of the predator were evaluated. *C. externa* individuals were kept in Petri dishes of 5 cm in diameter containing one leaf disk of elephant grass infested with aphids. The dishes were kept in climate chamber with 500 ppm CO<sub>2</sub> or with fluctuating CO<sub>2</sub> (average 368 ppm) or greenhouse (average 440 ppm). The treatment with fluctuating CO<sub>2</sub> in growth chamber provided a faster development of first and second instars, and larval and pre-imaginal phases of the predator compared to the 500 ppm CO<sub>2</sub> treatment. The duration of all parameters evaluated of *C. externa* was around 1.5 times higher in greenhouse when compared with those kept in climate chamber. There was no significant difference in the survival of predator when kept in environment with 500 ppm or fluctuating CO<sub>2</sub>. However, these environments led the predator to a higher survival in the third instar, larval and pre-imaginal phases when compared to those kept in greenhouse. In climate chamber, the increase of atmospheric CO<sub>2</sub> concentration delayed the development of immature stage of *C. externa*. However, survival was maintained so that the predator may be used in these conditions as a natural enemy.

**Keywords:** Aphids, biological control, climate change, predator



## Introdução

A concentração de dióxido de carbono na atmosfera tem aumentado desde a era pré-industrial, passando de 280 para 379 ppm em 2005, e é esperado que esse nível dobre nos próximos 100 anos (IPCC, 2007). Existem evidências de que a alta concentração de CO<sub>2</sub> pode ter efeitos diretos e indiretos sobre as plantas, seus herbívoros e inimigos naturais (STILLING et al, 2002). Sabe-se que os crisopídeos durante o estágio larval são agentes de controle biológico de espécies de afídeos de ocorrência em forrageiras (AUAD et al. 2009 e OLIVEIRA et al. 2010). No Brasil, uma das espécies mais estudadas é *Chrysoperla externa* devido a sua ampla dispersão e dieta polífaga, podendo ser encontrado em várias culturas (OLIVEIRA et al., 2010). Além disso, esse predador tem alta capacidade reprodutiva no cenário atual. No entanto, é importante entender como as mudanças climáticas globais podem influenciar os aspectos biológicos de *C. externa*. Assim, objetivou-se verificar se o aumento da concentração do CO<sub>2</sub> atmosférico influencia os aspectos biológicos de *C. externa*.

## Material e Métodos

O predador *C. externa* e a presa, *Sipha flava* foram obtidos a partir da criação massal de insetos na casa de vegetação da Embrapa Gado de Leite, sede em Juiz de Fora, Minas Gerais. Larvas recém- eclodidas de *C. externa* foram individualizadas em placas de Petri com cinco centímetros de diâmetro contendo uma camada de ágar coberto por seções foliares de capim elefante infestados por afídeos *S. flava*, disponibilizados ao predador *ad libitum*.

Os insetos foram submetidos a três diferentes ambientes, sendo: câmara climatizada com CO<sub>2</sub> em concentração constante a 500ppm; câmara climatizada com CO<sub>2</sub> flutuante (média de 368 ppm de CO<sub>2</sub>) ou casa de vegetação (média de 440 ppm de CO<sub>2</sub>). Os dados abióticos foram registrados diariamente através de um *datalogger*. Nas câmaras climáticas a temperatura diurna foi de  $25 \pm 2$  °C e a noturna de  $20 \pm 2$  °C, fotofase de 14 horas, e umidade relativa de  $70 \pm 10\%$ . Na casa de vegetação registraram-se médias de temperatura de 18 °C e 71 % de umidade relativa.

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com 20 repetições por ambiente, sendo avaliados diariamente a duração e a sobrevivência de cada instar, da fase larval, pupal e pré-imaginal de *C. externa*. Os dados referentes à duração e a sobrevivência foram submetidos à análise de variância e comparadas pelo teste Scott Knott, a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Verificou-se menor duração do primeiro e segundo ínstaes, período larval e pré-imaginal de *C. externa* mantido em ambiente com concentrações de CO<sub>2</sub> flutuante (média de 368 ppm), comparado àquelas submetidas a ambiente com concentração constante de CO<sub>2</sub> (500 ppm) (Tabela 1), indicando que o alto nível desse gás retardou o processo de desenvolvimento do predador, já que nesses ambientes os demais fatores abióticos eram idênticos. Resultados contrários foram relatados por Gao et al. (2010), que constataram duração significativamente menor no primeiro instar de *Chrysopa sinica* alimentado de *A. gossypii* e mantidos sobre elevada concentração de CO<sub>2</sub> (750 ppm) em comparação a aqueles submetidos ao CO<sub>2</sub> ambiente (375 ppm); além disso, esses autores não constataram diferença significativa na duração das larvas de segundo instar e no período larval.

A duração do terceiro instar e período pupal das larvas nos ambientes com alta concentração de CO<sub>2</sub> não apresentaram diferença significativa em relação ao tratamento mantido em câmara com concentrações de CO<sub>2</sub> flutuante. Esse resultado diferiu de Gao et al. (2010), que registraram maior duração do terceiro instar e período pupal de *Chrysopa sinica* em ambientes com elevada concentração de CO<sub>2</sub>, e Chen et al (2005) que relataram desenvolvimento acelerado do período pupal do coccinelídeo *Leis axyridis* submetidos a

concentração de 750ppm de CO<sub>2</sub>. No entanto é importante ressaltar que a duração total *C. externa* foi significativamente maior quando mantido em condições de CO<sub>2</sub> elevado.

O ambiente de casa de vegetação proporcionou aumento na duração, em torno de 1,5 vezes, em todos os instares, fases larval, pupal e pré-imaginal, comparado com os ambientes com CO<sub>2</sub> controlado ou flutuante. Essa diferença não pode ser atribuída ao nível de CO<sub>2</sub>, pelo fato que outros fatores abióticos não foram controlados, como a temperatura, que foi menor do que nos ambientes de câmaras climatizadas.

A sobrevivência das larvas de *C. externa* durante o terceiro instar, o período larval e pré-imaginal em casa de vegetação foi inferior àquelas submetidas aos ambientes controlados. Nos ambientes com CO<sub>2</sub> controlado e flutuante não houve diferença significativa na sobrevivência dos diferentes instares, fases larval, pupal e pré-imaginal. Gao et al (2010) também relataram que não houve diferença significativa na sobrevivência dos estádios larvais e período pré-imaginal ao submeter *Chrysopa sinica* predando *Aphis gossypii* em alta concentração de CO<sub>2</sub>. Esses resultados sugerem que altos níveis de CO<sub>2</sub> não afetam a sobrevivência desse predador e, portanto, ele pode ser utilizado como inimigo natural, ressalvado o fato de que seu desenvolvimento se torna mais lento nessa condição.

**Tabela 1.** Duração (dias) e viabilidade (%) média dos instares, fase larval, pupal e pré-imaginal de *Chrysoperla externa*, alimentados com *Sipha flava* e mantidos em ambientes com diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>.

Tratamento	Duração (dias)					
	L1	L2	L3	Larval	Pupal	Total
CO <sub>2</sub> controlado (500 ppm)	5,57 b	5,21 b	8,00 a	18,73 b	12,85 a	31,58 b
CO <sub>2</sub> flutuante (média = 368ppm)	4,68 a	3,90 a	7,21 a	15,28 a	13,16 a	28,44 a
Casa de vegetação (média = 440ppm)	8,45 c	7,56 c	10,38 b	26,50 c	18,40 b	44,90 c
Tratamento	Viabilidade (%)					
	L1	L2	L3	Larval	Pupal	Total
CO <sub>2</sub> controlado (500 ppm)	100,00 ns	90,00 ns	100,00 b	90,00 b	95,00 ns	85,00 b
CO <sub>2</sub> flutuante (média = 368ppm)	100,00 ns	95,00 ns	88,75 b	85,00 b	100,00 ns	85,00 b
Casa de vegetação (média = 440ppm)	85,00 ns	80,00 ns	64,25 a	45,00 a	87,50 ns	40,00 a

Médias seguidas de letras distintas nas colunas diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $P \leq 5\%$ ). ns = não significativo.

## Conclusões

Nas câmaras climatizadas, o aumento da concentração do CO<sub>2</sub> atmosférico retardou o desenvolvimento da fase imatura de *C. externa*; no entanto, a sobrevivência não foi alterada. Assim, mesmo com o possível aumento na concentração do CO<sub>2</sub> atmosférico, dentro de um nível de até 500 ppm, seria possível o uso desse inimigo natural, embora seu desenvolvimento se torne mais lento.

## Agradecimentos

À Fapemig, Unipasto e ao CNPq pelo suporte financeiro a pesquisa.

## Literatura citada

- AUAD, A. M.; OLIVEIRA, S. A.; CARVALHO, C. A.; SILVA, D. M.; RESENDE, T. T.; VERISSIMO, B. A. The impact of temperature on the biological aspects and life table of *Rhopalosiphum padi* (hemiptera: aphididae) fed with signal gras. **The Florida Entomologist**, v. 92, n. 4, p. 569-577, 2009.
- CHEN, F.; GE, F.; PRAJULEE, M. N. Impact of elevated CO<sub>2</sub> on tri-trophic interaction of *Gossypium hirsutum*, *Aphis gossypii*, and *Leis axyridis*. **Environmental Entomology**, v. 34, n. 1, p. 37-46, 2005.

FOURTH Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Geneva: Intergovernmental Panel on Climate Change - IPCC, 2007.

GAO, F., CHEN, F.; FENG, G. Elevated CO<sub>2</sub> lessens predation of *Chrysopa sinica* on *Aphis gossypii*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 135, n. 2, p. 135-140, 2010.

OLIVEIRA, S. A.; AUAD, A. M.; SOUZA, B.; SILVA, D. M.; CARVALHO, C. A. Effect of temperature on the interaction between *Chrysoperla externa* (Neuroptera: Chrysopidae) and *Sipha flava* (Hemiptera: Aphididae). **European Journal of Entomology**, v. 107, n. 2, p. 183-188, 2010.

STILING, P.; CATTELL, M.; MOON, D. C.; ROSSI, A.; HUNGATE, B. A.; HYMUS, G.; DRAKE, B. Elevated atmospheric CO<sub>2</sub> lowers herbivore abundance, but increases leaf abscission rates. **Global Change Biology**, v. 8, n. 7, p. 658-667, 2002.

## Tolerância diferencial de clones de capim-elefante ao alumínio tóxico

Marlene Aparecida Cantarino<sup>1</sup>; Carlos Eugênio Martins<sup>2</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>2</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>2</sup>, Fernando Teixeira Gomes<sup>3</sup>, Alexandre Magno Brighenti<sup>2</sup>; Anne Caroline Barbosa de Carvalho<sup>4</sup>, Ricardo Ottoni da Silva<sup>5</sup>; Leandro de Senna Monaia<sup>5</sup>; Taís Helena Silva de Oliveira<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Aluna de graduação em Biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora - Bolsistas PIBIC Fapemig/Embrapa Gado de Leite – Av. Luz do Interior, 345 – Bairro Estrela Sul – 36030-776 - Juiz de Fora/MG – marlene.cantarino@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, CEP 36038-300, Juiz de Fora/MG – carlos.eugenio@embrapa.br

<sup>3</sup>Professor do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF) - Av. Luz do Interior, 345 – Bairro Estrela Sul – 36030-776 - Juiz de Fora/MG - ftgomes2002@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Aluna de mestrado em Ecologia – Universidade Federal de Juiz de Fora – Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário – Bairro São Pedro – 36036-900. Bolsista Capes.

<sup>5</sup>Biólogos formados pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF) - Av. Luz do Interior, 345 –Bairro Estrela Sul – 36030-776 - Juiz de Fora/MG.

<sup>6</sup>Aluna de graduação em Geografia – Universidade Federal de Juiz de Fora – Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário – Bairro São Pedro – 36036-900. Bolsistas PIBIC Fapemig/Embrapa Gado de Leite.

**Resumo:** A seleção de gramíneas forrageiras tolerantes ao alumínio tóxico é etapa indispensável em programas de melhoramento que procuram identificar materiais mais produtivos e de maior adaptabilidade em condições de estresse. Espécies e variedades diferem quanto à tolerância ao Al. Portanto, a identificação e a seleção de clones tolerantes são vantajosas para a agricultura. Com o objetivo de avaliar a resposta de 44 clones de Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) ao alumínio tóxico foi realizado um experimento em casa de vegetação. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Após a brotação da forrageira em substrato comercial, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 2 L de solução nutritiva. Durante os primeiros sete dias as plantas cresceram em solução nutritiva com metade da concentração de nutrientes recomendada, sem aplicação de alumínio. Depois desta etapa e durante 29 dias, promoveu-se, semanalmente, a troca da solução nutritiva, acrescida de 15 mg/L de alumínio. Foram avaliadas a produção de matéria verde e seca de parte aérea (MVPA e MSPA) e de raiz (MVR e MSR), a relação entre matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR), os incrementos no número de perfilhos (INP), no crescimento da parte aérea (IPA) e das raízes (IR), além do índice de seleção (IS). Existe variabilidade genética entre os 44 clones de *Pennisetum purpureum* para a tolerância ao alumínio. O BAG 68 (Cameroon), foi o que apresentou o menor valor de índice de seleção, evidenciando grande capacidade de adaptação a solos com maiores concentrações de alumínio. A produção de matéria seca da parte aérea, também, foi maior no BAG 68 (Cameroon).

**Palavras-chave:** Toxidez por alumínio, genética vegetal, melhoramento de forrageiras, produção de forragem, capim-elefante

**Abstract:** The selection of aluminum tolerance tropical forage grass is an important step in a plant breeding program that aims to identify more productive genotypes with higher adaptability under stress conditions. Species and varieties differ in Al tolerance. Therefore, the identification and selection of tolerant genotypes are advantageous for the agricultural. With the aim of evaluating response of 44 clones of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) to the toxic aluminum an experiment was realized at green house. Was used

the completely randomized design, with three replications. After the forage budding in commercial substrate, the seedlings were transferred for plastic vases with capacity for 2 L of nutritious solution. During the first week the plants grew in nutritious solution with half of the concentration of nutrients recommended, without aluminum application. After this stage and for 29 days, the nutrient solution was weekly changed, with addition of 15 mg/L of aluminum. Were evaluated the green matter production of shoots and roots (MVPA and MVR), the dry matter production of shoots and roots (MSPA and MSR), the ration between dry matter and green matter of shoots and roots (MSMVPA and MSMVR), the increase in the growth of shoot and roots (IPA and IR), the increase in the number of tillers (INP), and the selection index. There is genetic variability among the 44 clones of *Pennisetum purpureum* for the aluminum tolerance. The BAG 68 (Cameroon) presented the smallest selection index value, evidencing great adaptation capacity to soils with larger aluminum concentrations. The dry matter production of the shoot, also, was larger in BAG 68 (Cameroon).

**Keywords:** Aluminium toxicity, plant genetics, fodder breeding, forage production, elephant grass.

## Introdução

O baixo rendimento das culturas não adaptadas deve-se a elevada acidez e toxicidade por alumínio presente nos solos brasileiros destinados a produção vegetal (SOUZA, LOBATO, 2004). A grande concentração desse elemento nos solos ácidos afeta diretamente os processos fisiológicos e metabólicos de diversas espécies cultivadas as quais podem apresentar como principais fatores o retardamento do crescimento radicular e da parte aérea redução dos números de raízes laterais (MATIELLO et al., 2008).

Por afetar o alongamento e a divisão celular, a redução no crescimento radicular de plantas é considerada como principal efeito de níveis tóxicos de alumínio (Al). Para contornar este problema, a exploração do potencial genético dos cultivares tem sido usada, pois se sabe que espécies e variedades diferem na tolerância ao excesso de Al daí, a identificação e a seleção de genótipos tolerantes serem vantajosas, independentes do grau de tecnologia utilizado. A seleção de plantas tolerantes ao Al constitui-se numa técnica rápida e eficiente, visando à adaptação das plantas ao meio ambiente, permitindo manter a produtividade em níveis elevados e racionalizando o uso de insumos.

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) constitui uma planta perene da família *Poaceae*, de grande interesse econômico para a pecuária leiteira nacional, tem sido amplamente utilizado em decorrência de sua alta produtividade e valor nutritivo, apresentando ótima palatabilidade, além de elevado vigor e persistência. Entretanto, é considerada uma espécie muito exigente, não se adaptando a solos de baixa fertilidade e de elevada saturação por alumínio. Dentre as características negativas apresentadas se destaca o amarelamento das folhas pela interferência na biossíntese da clorofila, arroxamento nas bainhas, margens do limbo e atrofiamento (FOY, 1974; BEN et al., 1976; CODIGNOTTO et al., 2002; PEIXOTO et al., 2007). Porém, verifica-se a ocorrência de espécies com poder de tolerância a altas concentrações deste metal, devido a sua complexação com ácidos orgânicos exsudados pelo sistema radicular. O fato de espécies e variedades de capim elefante apresentar respostas diferenciais quando expostas a altas concentrações de alumínio, tem estimulado não só o seu cultivo como também o seu melhoramento genético visando selecionar clones mais tolerantes.

Há um número considerável de trabalhos que avaliaram o desenvolvimento de gramíneas forrageiras quanto à tolerância ao Al, especialmente, as espécies de *Brachiaria* sp (WENZL et al., 2003, CANTARINO et al., 2011) e *Panicum maximum* (OLIVEIRA et al., 2000) e mais recentemente na espécie de *Pennisetum purpureum* (MARTINS et al., 2005). MARTINS et al. (2006) encontraram grande variabilidade genética entre os genótipos de capim-elefante para a tolerância ao alumínio, sendo as características peso seco de raízes (PSR) e incremento no crescimento de raízes (IR), as que não foram influenciados pela presença do alumínio em solução. Por outro lado, o número de perfilhos foi a

característica mais influenciada, passando de 1,4 para 5,6 perfilhos por plantas considerando a média dos dois tratamentos.

O objetivo deste experimento foi avaliar a resposta diferencial de 44 genótipos de capim-elefante ao Al tóxico.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora/MG, entre 13 de setembro a nove de novembro de 2011.

Utilizou-se como planta indicadora, 44 clones (genótipos) de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) e da Rede Nacional de Avaliação de *Capim Elefante* (RENACE) vinculados ao programa de melhoramento genético de Capim-elefante da Embrapa Gado de Leite: BAG 54, BAG 69, BAG 57, BAG 75, BAG60, BAG03, BAG 11, BAG 26, BAG 35, BAG 28, BAG 21, BAG 39, BAG 33, BAG 25, BAG 32, BAG 02, BAG 29, BAG 23, BAG 10, BAG 27, BAG45, BAG 44, BAG 01, BAG 49, BAG 37, BAG20, BAG 05, BAG 50, BAG 53, BAG 17, BAG 18, BAG 07, BAG 55, BAG 12, BAG52, BAG 54, BAG 66, BAG 09, BAG 65, BAG 62, BAG 67, BAG61, BAG 64, BAG 68. Os genótipos BAG 68 (Cameroon) e Bag 23 (Napier SEA) foram utilizados como testemunhas. Nós dos diferentes clones foram colocados para brotar em bandejas contendo substrato comercial, irrigadas diariamente com água destilada. Após 21 dias, as plântulas que apresentavam homogeneidade quanto ao comprimento radicular e, quando possível, ao comprimento da parte aérea, foram selecionadas e transplantadas para vasos plásticos contendo dois litros de solução nutritiva (CLARK, 1975), aerada. Durante a transferência, foram medidos: comprimento inicial da raiz principal e da parte aérea. A temperatura no interior da casa de vegetação variou de 22 a 28 °C.

Os vasos plásticos foram pintados com tinta preta betuminosa e alumínica e internamente revestidos com uma sacola preta para evitar a passagem de luz e inibir o desenvolvimento de algas. Durante os primeiros 14 dias as plantas cresceram em solução nutritiva com metade da concentração de nutrientes recomendada, sem aplicação de alumínio. Daí em diante e durante 29 dias, promoveu-se, semanalmente, a troca da solução nutritiva (completa), acrescida de 15 mg/L de alumínio. Após o período mencionado, as plantas foram retiradas dos vasos, o sistema radicular foi seccionado da parte aérea, lavado com água destilada e seu comprimento novamente medido. Também foi medido o comprimento final da parte aérea. O excesso de umidade do sistema radicular foi retirado com papel absorvente, procedendo-se, em seguida, à pesagem e acondicionamento em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar (96 horas a 55 °C). Foram avaliados: a produção de matéria verde e seca da parte aérea e raízes (MVPA, MSPA, MVR e MSR), o incremento no crescimento da parte aérea e das raízes (IPA e IR), expresso pela diferença entre o crescimento final e o inicial, além do incremento no número de perfilhos (INP), também expresso pela diferença entre o número de perfilhos no final e no início do experimento. A partir dos atributos avaliados, determinou-se o índice de seleção (IS), bem como a relação entre a matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR).

Os índices de seleção são combinações lineares de valores fenotípicos, resultando numa medida que concentra um único valor, os atributos positivos e negativos de cada genótipo para vários caracteres. Por necessitarem das estimativas de variância e covariância genotípicas e fenotípicas dos caracteres, esses índices são mais indicados para programa de seleção recorrente (FARIAS, 2005).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Cada unidade experimental consistiu de um vaso contendo uma planta. Foi efetuada a análise de variância dos resultados e aplicação do teste de médias (SCOTT-KNOTT, 1974), a 5 % de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Os resultados de matéria verde e seca de parte aérea (MVPA e MSPA) e de raiz (MVR e MSR), a relação entre matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR), os incrementos no número de perfilhos (INP), na parte aérea (IPA) e na raiz (IR), além do índice de seleção (IS), em 44 clones de capim-elefante, encontram-se descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Produção de matéria verde e seca da parte aérea (MVPA, MSPA) e raízes (MVR, MSR), relação entre a matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR) e incremento no número de perfilhos (INP), de 44 clones de capim-elefante.

Clones	MVPA	MSPA	MVR	MSR	MSMVPA	MSMVR	INP	IPA	IR	IS
BAG 68	105,37 a	13,69 a	31,97 b	3,35 a	0,13 a	0,10 a	3 a	106,4 a	43,7 a	115
BAG 55	112,27 a	12,07 a	40,43 a	3,72 a	0,11 a	0,09 a	4 a	123,7 a	39,3 a	117
BAG 07	101,89 a	12,22 b	52,35 a	4,25 a	0,12 a	0,08 b	3 a	111,1 a	39,1 a	147
BAG 53	91,54 a	13,25 a	34,95 b	3,03 a	0,14 a	0,08 b	4 a	103,7 a	27,9 b	163
BAG 54	97,21 a	12,56 a	27,07 b	2,69 a	0,13 a	0,10 a	1 b	114,3 a	25,8 b	169
BAG 33	90,39 a	11,62 a	31,38 b	3,01 a	0,13 a	0,10 a	4 a	101,4 a	27,2 b	179
BAG 01	109,04 a	12,93 a	31,74 b	3,05 a	0,12 a	0,10 a	2 b	106,0 a	20,7 b	187
BAG 61	98,07 a	10,71 a	29,21 b	2,33 b	0,11 a	0,08 b	2 b	122,0 a	35,6 b	187
BAG 51	94,47 a	11,04 a	28,37 b	2,75 a	0,12 a	0,10 a	2 b	104,5 a	32,9 b	188
BAG 37	103,95 a	11,48 a	27,45 b	2,71 a	0,11 a	0,10 a	3 a	109,1 a	21,0 b	190
BAG 62	83,68 a	10,83 a	25,75 b	2,22 b	0,13 a	0,09 b	3 b	123,5 a	26,2 b	192
BAG 11	92,14 a	10,76 a	27,80 b	2,95 a	0,12 a	0,11 a	1 b	100,3 a	36,6 b	206
BAG 02	105,04 a	12,77 a	31,31 b	2,61 a	0,12 a	0,08 b	3 a	96,5 a	33,7 b	207
BAG 64	81,26 a	8,97 b	22,89 c	2,16 b	0,11 a	0,10 a	3 a	123,9 a	28,1 b	208
BAG 67	86,81 a	8,45 b	30,63 b	1,79 b	0,11 a	0,07 b	3 b	117,4 a	43,8 a	218
BAG 03	91,22 a	7,44 b	23,97 c	2,31 b	0,08 a	0,09 a	3 a	108,7 b	45,9 a	223
BAG 39	61,99 b	8,06 b	19,15 c	1,94 b	0,13 a	0,10 a	5 a	111,3 a	28,4 b	223
BAG 69	65,59 b	8,24 b	20,09 c	2,13 b	0,13 a	0,11 a	2 b	111,3 a	37,0 b	225
BAG 18	77,53 b	10,04 a	20,97 c	2,12 b	0,13 a	0,10 a	3 a	105,5 a	24,7 b	231
BAG 45	87,72 a	9,97 a	21,55 c	1,64 b	0,12 a	0,07 b	4 a	110,3 a	30,3 b	235
BAG 26	86,30 a	10,07 a	26,10 b	2,47 a	0,12 a	0,09 a	3 b	102,5 a	22,9 b	241
BAG 44	76,32 b	8,86 b	20,62 c	1,72 b	0,12 a	0,09 b	1 b	113,2 a	59,7 a	244
BAG 35	82,53 a	9,58 a	24,08 c	2,25 b	0,11 a	0,09 a	3 a	102,2 a	28,8 b	250
BAG 60	65,14 b	7,75 b	15,65 c	1,70 b	0,12 a	0,11 a	3 a	105,8 a	39,2 a	252
BAG 21	61,34 b	8,52 b	19,29 c	2,07 b	0,14 a	0,11 a	4 a	94,4 b	33,5 b	253
BAG 29	88,02 a	9,70 a	25,53 b	2,16 b	0,11 a	0,08 b	3 a	99,2 a	37,0 b	259
BAG 50	57,26 b	6,75 b	20,50 c	1,73 b	0,12 a	0,08 b	4 a	108,1 a	39,5 a	259
BAG 20	80,33 a	8,21 b	20,57 c	2,13 b	0,10 a	0,10 a	4 b	99,3 a	32,9 b	261
BAG 57	73,76 b	7,92 b	21,68 c	2,34 b	0,11 a	0,11 a	1 b	101,7 a	36,9 b	269
BAG 59	73,22 b	9,33 a	16,73 c	1,55 b	0,13 a	0,09 a	2 b	107,4 a	32,4 b	275
BAG 28	90,28 a	9,94 a	27,18 b	2,23 b	0,11 a	0,08 b	4 a	92,4 b	17,7 b	278
BAG 49	62,52 b	8,12 b	22,26 c	1,75 b	0,13 a	0,07 b	4 a	87,1 b	51,2 a	289
BAG 66	45,05 b	5,34 b	18,47 c	1,77 b	0,12 a	0,09 a	4 a	97,0 b	40,4 a	297
BAG 17	86,33 a	8,20 b	20,23 c	1,83 b	0,08 a	0,11 a	4 a	81,7 b	26,8 b	307
BAG 65	66,32 b	6,52 b	20,41 c	2,06 b	0,10 a	0,10 a	2 b	95,6 b	51,3 a	307
BAG 23	46,79 b	5,14 b	9,86 c	1,07 b	0,11 a	0,11 a	4 a	89,7 b	50,9 a	310
BAG 32	70,39 b	7,22 b	17,95 c	1,33 b	0,10 a	0,08 b	1 b	123,7 a	34,7 b	314
BAG 52	54,85 b	6,22 b	18,68 c	1,52 b	0,11 a	0,08 b	4 a	94,7 b	50,7 a	316
BAG 75	73,85 b	8,00 b	24,42 c	2,15 b	0,11 a	0,09 b	4 a	75,2 b	28,1 b	316
BAG 12	70,15 b	7,29 b	17,25 c	1,78 b	0,10 a	0,10 a	1 b	97,0 b	47,6 a	322
BAG 09	40,58 b	4,49 b	17,43 c	1,58 b	0,11 a	0,09 b	3 a	84,7 b	52,8 a	337
BAG 05	65,05 b	7,59 a	26,73 c	2,07 b	0,12 a	0,08 b	1 b	67,1 a	30,0 b	358
BAG 10	53,22 b	5,64 b	15,51 c	0,99 b	0,11 a	0,07 b	3 b	99,5 a	24,0 b	383
BAG 25	52,27 b	5,20 b	14,65 c	0,83 b	0,10 a	0,06 b	2 b	98,2 a	45,5 a	383

Foi verificada variabilidade entre as características avaliada nos 44 clones. Baseado nestas características determinou-se o índice de seleção utilizado na discussão dos resultados.

O BAG 68 (Cameroon) foi o que apresentou o menor índice de seleção, demonstrando grande capacidade de adaptação a solos com elevadas concentrações de alumínio. Todos os demais clones apresentaram índice de seleção superior ao Cameroon, embora existam vários clones com valores de índice de seleção próximo.

O BAG 23 (Napier SEA), com índice de seleção de 310, foi posicionado em 36º lugar entre os 44 clones de capim-elefante, evidenciando menor tolerância à toxidez por alumínio.

Foram verificadas diferenças entre a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR). Na parte aérea a variação foi de 4,49 g para o BAG 09 a 13,69 para o BAG 68 (Cameroon), sendo que a média de MSPA dos 44 clones foi de 9,06 g. A matéria seca de raízes variou de 0,83 no BAG25 a 4,25 no BAG 07, sendo a média de MSR de 2,18 g.

Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que o crescimento do sistema radicular é a característica mais afetada tanto na susceptibilidade quanto na tolerância a fatores de acidez do solo (HOWELER & CAVADID, 1976), fato este comprovado no experimento. Resultados contrários foram obtidos por Martins et al. (2006) trabalhando com 32 genótipos de capim-elefante. Os autores concluíram que o peso seco de raízes e o incremento no crescimento de raízes (crescimento líquido do sistema radicular), foram as características não influenciadas pela presença do alumínio em solução nutritiva.

Ao se avaliar o incremento na parte aérea (IPA) observa-se que a média foi de 102,92 cm, variando de 67,1 cm no BAG 05, a 123,9 cm no BAG 64. O valor médio de incremento de raiz foi de 35,51 cm, variando de 17,7 cm no BAG 28 a 59,7 no BAG 44.

Quanto ao incremento no número de perfilhos (INP) a média observada foi de 2,96 perfilhos por genótipos. O clone que apresentou o maior incremento no número de perfilhos foi o BAG 39, com 5 perfilhos, enquanto vários clones apresentaram um único perfilho.

Os resultados observados nesse trabalho evidenciam a possibilidade de identificação e seleção de genótipos de *Pennisetum purpureum* tolerantes/resistentes ao alumínio tóxico presente na solução do solo, com melhora adaptação aos solos ácidos, encontrados em abundância na paisagem brasileira.

## Conclusões

- Há variabilidade genética entre os 44 clones de *Pennisetum purpureum* para a tolerância ao alumínio em solução nutritiva;
- O BAG 68 (Cameroon), foi o que apresentou o menos índice de seleção, evidenciando grande capacidade de adaptação a solos com elevadas concentrações de alumínio;
- A produção de matéria seca da parte aérea, foi maior no BAG 68 (Cameroon), comparada aos demais clones.

## Agradecimentos

À Fapemig

## Literatura Citada

BEN, J. R.; MORELLI, M.; ESTEFANEL, E. Influência da calagem na toxidez de alumínio para plantas de cevada. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 177-189, 1976.

CANTARINO, M. A.; MARTINS, C. E.; ROCHA, W. S. D. da; SOUZA SOBRINHO, F. de S.; GOMES, F. T.; BRIGHENTI, A. M.; SILVA, R. O.; MONAIA L. de S. Resposta da Brachiária



ruzizensis ao alumínio tóxico presente em solução nutritiva. In: Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite. VIII. 2011. **Anais...** Juiz de Fora/MG. Embrapa Gado de Leite, 2011. 4p. CDROM.

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase in intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1975, v. 23, p. 458-460.

CODOGNOTTO, L. M.; SANTOS, D. M. M.; LEITE, I. C.; MARIN, A.; MADALENO, L. L.; KOBORI, N. N.; BANZATTO, D. A. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. **Revista Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 27, n. 2, p. 27-39, 2002.

FARIAS **Índice de seleção em cultivares de algodoeiro herbáceo**. Universidade federal de Lavras. Lavras, MG. 2005. 122p. Tese de Doutorado.

FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth, In: CARSON, E. W. Ed. The plant root and its environment. **Charlottesville, University Press of Virginia**, 1974, p. 601-642.

HOWELER, R.H.; CAVADID, L.F. Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrients solutions as compared with a field screening method. **Agronomy Journal**. V. 68, 551-555. 1976.

MARTINS, C.E.; GOMES, F.T.; CÓSER, A.C.; MACHADO, V.S.; FERNANDES, N.R.A.; ALVES, F.C.T.; FREITAS, A.T. Avaliação de genótipos de capim-elefante quanto à tolerância ao alumínio. In: REUNIÓN DE LA ASOCIACION LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL. 19. REUNIÓN DE LA ASOCIACION DE PRODUCCIÓN ANIMAL. 33. CONGRESO DE DOBLE PROPÓSITO, 4... 2005. **Anais...** Tampico- México, 2005. p 345-348.

MARTINS, C. E.; SOUZA SOBRINHO, F.; GOMES, F. T.; CÓSER, A. C.; DERESZ, F.; ALVES, D. B.; ALMEIDA, M.; MORAES, L. E.; ALVES, F. C. T. Tolerância de genótipos de capim-elefante ao alumínio em solução. In: CONGRESSO PANAMERICANO DO LEITE. 9. 2006, **Anais...** Juiz de Fora. Embrapa Gado de Leite, 2006. p. 99-102.

MATTIELLO, E.M.; PEREIRA, M.G.; ZONTA, E.; MAURI, J.; MATTIELLO, J.D.; MEIRELES, P.G.; SILVA, I.R. Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canephora* e *Coffea arabica* sob influência da atividade do alumínio em solução. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2008, 32,1/6: 425-434.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n.1, p.17-25, 2007.

COTT, A. J. & KNOTT, M. A. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, 30: 507-512, 1974.

WENZL, P.; MANCILLA, L.I.; MAYER, J.E.; ALBERT, R. & RAO, I.M. Simulating acid soils with nutrient solutions: The effects on *Brachiaria* species. **Soil Science Society of American Journal**, v.67, n.3, p.1457-1469, 2003.

# Armazenamento de pólen de *Brachiaria* para realização de cruzamentos controlados<sup>1</sup>

Rafaela Venançoni Matoso<sup>2</sup>, Anna Carolina Pereira Staico<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>3</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trabalho parcialmente financiado com recursos do CNPq e Fapemig.

<sup>2</sup>Aluna de graduação do curso de Biologia do Centro de Ensino Superior (CES) de Juiz de Fora. e-mail: matosorv@gmail.com

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite. e-mail: flavio.benites@embrapa.br; fausto.souza@embrapa.br

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do armazenamento de pólen de *Brachiaria* em condições ambientais. Foram avaliados três genótipos de *Brachiaria* (duas plantas de *B. ruziziensis* e a *B. decumbens* cultivar Basilisk) e quatro dias de armazenamento de inflorescências em condições ambientais. A coleta de pólen foi realizada diariamente pela manhã, procedendo-se à fixação e coloração do mesmo em lâminas. Os resultados evidenciaram a existência de diferenças entre os genótipos para a viabilidade do pólen. Observou-se uma queda de sete pontos percentuais na viabilidade do pólen após quatro dias de armazenamento das inflorescências em condições ambientais. Constatou-se, portanto, que é possível armazenar inflorescências de *Brachiaria* após a retirada das plantas, mantendo-se a viabilidade do pólen elevada.

**Palavras-chave:** conservação, hibridação, viabilidade polínica.

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the efficiency of *Brachiaria* pollen storage under environmental conditions. Three different genotypes of *Brachiaria* (two plants of *B. ruziziensis* and *B. decumbens* cv Basilisk) and four days of inflorescences storage under environmental conditions. The pollen was collected and fixed every morning. The results showed the existence of differences among genotypes for the viability of pollen. There was a drop of seven percentage points in pollen viability after four days of the inflorescences storage under ambient conditions. It was found, therefore, it is possible to store inflorescences *Brachiaria* after removal of the plants, while maintaining the high pollen viability.

**Keywords:** conservation, hybridization, pollen viability

## Introdução

O melhoramento genético vegetal utiliza como uma das principais estratégias a realização de hibridações ou de cruzamentos intra ou interespecíficos. Quando os cruzamentos a serem realizados são controlados, exige-se, na maioria das vezes a coleta de pólen. Em alguns casos, o armazenamento deste pólen pode ser essencial para a viabilização dos cruzamentos em função, por exemplo, do florescimento não sincronizado dos parentais envolvidos.

Informações sobre a viabilidade e armazenamento de pólen em *Brachiaria* são escassas na literatura e o programa de melhoramento de *B. ruziziensis*, conduzido pela Embrapa Gado de Leite, necessita delas para maior sucesso nos cruzamentos realizados. O objetivo, portanto, foi avaliar a eficiência do armazenamento de pólen de *Brachiaria* em condições ambientais.

## Material e Métodos

Foram utilizados dois genótipos de *Brachiaria ruziziensis* (plantas CIG2010#104 e JAG2010#33) e a cultivar comercial (Basilisk) de *B. decumbens*. Esses genótipos foram escolhidos de acordo com a disponibilidade de inflorescências no período de condução do experimento, que foi na primeira quinzena de novembro de 2011. As plantas de *B.*

*ruzizensis* eram mantidas em casa de vegetação, em vasos (5L) contendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco (1:1:1). No final de outubro e início de novembro ocorreu o florescimento fora de época de algumas plantas de *B. ruzizensis*, favorecendo a realização do experimento. Nesta época as plantas de *B. decumbens* também se encontravam em pleno florescimento.

As inflorescências das plantas foram coletadas pela manhã do dia 07/11/2011, cortando-se pelo menos 30 cm de caule para formar um conjunto. Cada conjunto de inflorescências foi colocado dentro de um erlenmeyer contendo água, onde permaneceu por 5 dias. Por quatro dias consecutivos (8 a 11/11/2011), sempre na parte da manhã, procedeu-se a retirada do pólen. Cada conjunto foi colocado sobre uma folha de papel branco e as inflorescências foram balançadas para a liberação do pólen. Este, por sua vez, foi recolhido em placa de vidro (placas de Petri).

Imediatamente após a coleta procedeu-se a fixação do pólen em lâminas utilizando o corante de Alexander conforme recomendado por Timbó et al. (2011). De cada material genético, em cada um dos dias de coleta, foram preparadas nove lâminas (repetições). Estas foram armazenadas em geladeira (8°C) por 24h para posterior contagem dos grãos de pólen viáveis empregando-se microscópio. Em cada uma das lâminas foi realizada a avaliação de cinco campos, considerando-se como viáveis os grãos de pólen que apresentavam a coloração roxa, e inviáveis os verdes.

Os dados da porcentagem de pólen viáveis foram submetidos à análises de variância considerando-se o delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial (3 genótipos e 4 dias de armazenamento). As médias dos diferentes tratamentos foram comparadas utilizando o teste de Scott-Knott.

## Resultados e Discussão

Os resultados das análises de variância mostraram efeitos significativos para genótipos e dias de armazenamento, evidenciando que a viabilidade do pólen é influenciada pelo material genético e pelo tempo de armazenamento. A interação entre estes dois fatores, por outro lado, não foi significativa, indicando que a viabilidade dos diferentes genótipos é consistente ao longo do período de armazenamento avaliado (Tabela 1).

**Tabela 1.** Resumo dos resultados da análise de variância para a porcentagem de viabilidade do pólen de genótipos de *Brachiaria*, considerando-se o armazenamento das inflorescências em condições ambientais

FV	GL	QM	Pr > Fc
Rep	5	36,8337	0,2051
Genótipo	2	384,3899	0,0001
Dia	3	87,9359	0,0290
Genótipo*Dia	6	26,8563	0,0290
Erro	15	22,2016	0,3542
Total corrigido	31		
CV (%)	5,35		
Média geral	88,1484		

A média da porcentagem de grãos de pólen viáveis dos três genótipos considerando-se todo o período de armazenamento das inflorescências foi de 88,1%. A amplitude de variação observada foi de 13 pontos percentuais, sendo o genótipo CIG 2010#104 o que apresentou a maior viabilidade do pólen (94%). A *B. decumbens* apresentou viabilidade intermediária entre os dois genótipos de *B. ruzizensis* (Tabela 2). Esses valores são semelhantes a resultados da literatura para genótipos de *B. ruzizensis* (TIMBÓ et al., 2011) e superior quando envolve genótipos oriundos de cruzamentos interespecíficos de *Brachiaria* (RISSO-PASCOTTO et al., 2005).

**Tabela 2.** Porcentagem de viabilidade do pólen de acordo com cada genótipo e dia de armazenamento

Genótipo	% Viabilidade	Scott-Knott*
JAG 33	81,64	c
<i>Decumbens</i>	87,24	b
CIG 104	94,62	a
<b>Data</b>		
4	83,30	b
3	85,86	b
1	90,26	a
2	90,32	a

\* Médias seguidas por letras diferentes na coluna indica diferença significativa pelo Teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade.

Em termos médios, observou-se uma queda de sete pontos percentuais na viabilidade do pólen após quatro dias de armazenamento das inflorescências em condições ambientais. Mesmo assim a germinação do pólen após esse período pode ser considerada bastante elevada, compatível com resultados da literatura para o gênero (TIMBÓ et al., 2011; RISSO-PASCOTTO et al., 2005). Constata-se, portanto, que o armazenamento das inflorescências dentro de recipientes com água por um período de até quatro dias permite a coleta de pólen viável para a realização de cruzamentos controlados em *Brachiaria*. Essa metodologia facilita a realização de alguns cruzamentos, principalmente quando os diferentes genitores envolvidos não se encontram no mesmo local. Além do mais, permite a coleta de inflorescências de cada parental masculino apenas uma vez na semana, proporcionando coletas de pólen com alta germinação para realização de cruzamentos nesse período.

## Conclusões

A viabilidade dos grãos de pólen de *Brachiaria* é elevada.

É possível armazenar inflorescências de *Brachiaria* após a retirada das plantas, mantendo-se a viabilidade do pólen elevada.

## Agradecimentos

À Fapemig

## Literatura Citada

RISSO-PASCOTTO, C.; PAGLIARINI, M. S.; VALLE, C. B. Multiple spindles and cellularization during microsporogenesis in an artificially induced tetraploid accession of *Brachiaria ruziziensis* (Gramineae). **Plant Cell Rep**, v. 23, n. 8, p. 522–527, 2005.

TIMBÓ, A. L. ; PEREIRA, R. C. ; DAVIDE, L. C. ; SOBRINHO, F. S. Viabilidade polínica em plantas de *Brachiaria ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente. In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 20., 2011, Lavras, MG. **Anais...** Lavras, 2011. p. 1.

## Prospecção de microrganismos celulolíticos e/ou xilanolíticos em sistema de manejo de dejetos da pecuária leiteira\*

Camila Branda dos Reis<sup>1</sup>, Renata da Costa Barros Silva<sup>2</sup>, Ana Luíza de Moura Carmo<sup>1</sup>, Lorena Evangelista Fernandes<sup>1</sup>, Junior César Fernandes<sup>3</sup>; Marlice Teixeira Ribeiro<sup>3</sup>; Jailton da Costa Carneiro<sup>3</sup>; Marcelo Henrique Otenio<sup>3</sup>

\*Parte da monografia de conclusão do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF) do primeiro autor.

<sup>1</sup>Graduandas do Curso de Ciências Biológicas (CES-JF). Estagiárias de Iniciação Científica na Embrapa Gado de Leite. E-mail: camilabranda@gmail.com; naluizaa@hotmail.com; lorenafernandes2@gmail.com

<sup>2</sup>Mestranda em Genética e Biotecnologia (UFJF). Bolsista Capes. E-mail: rebarros\_503@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite. E-mail: junior.lima@embrapa.br; marlice.ribeiro@embrapa.br; jailton.carneiro@embrapa.br; marcelo.otenio@embrapa.br

**Resumo:** A existência de uma microbiota diversificada em efluentes intensifica a busca por microrganismos com importância biotecnológica neste. O objetivo deste trabalho foi prospectar microrganismos potencialmente celulolíticos e/ou xilanolíticos presentes em efluente da limpeza dos pisos de estábulos, tipo *free stall*, determinando suas características bioquímicas e morfológicas. Para a fermentação submersa aeróbica, foi colocado em um biorreator, 500 mL de efluente líquido estéril com 5 mL de efluente bruto não estéril. Foram realizadas coletas em diferentes tempos e alíquotas de 0,1 mL foram estriadas nos meios, *Violet Red Bile Agar* (incubadas a 35 °C), *Plate Count Agar* e no meio mínimo de HAAS (incubadas a 30 °C). Após o crescimento colônias foram selecionadas e estriadas novamente para a obtenção de isolados. Estes isolados foram cultivados em BHI caldo (*Brain Heart Infusion Broth*) para o aumento de massa celular. Ocorreram 5 experimentos semelhantes a este, com a concentração de celulose variando em 0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2%, em replicada. Foram obtidos 30 isolados, sendo 10 bacilos Gram positivos, 11 bacilos Gram negativos, 6 cocos Gram positivos e 3 leveduras. Dentre as bactérias isoladas, 9 foram móveis e 18 imóveis. No teste de degradação de carboidratos nenhuma das bactérias Gram negativas consumiu lactose. No teste enzimático, 1 bactéria apresentou potencial celulolítico e xilanolítico e uma apresentou atividade xilanolítica, levando-se à conclusão que no efluente de bovinos leiteiros existe uma microbiota com potencial em degradar celulose e/ou xilana.

**Palavras-chave:** bioprospecção, celulase, dejetos, xilanase.

**Abstract:** The existence of a diversified microbiota in effluents intensifies the search for microorganisms with biotechnological importance. The objective of this paper was to prospect potentially cellulolytic and/or xylanolytic microorganisms in effluents from the cleaning of floors of the barns, *free stall* type, determining their biochemical and morphological characteristics. For the submerged aerobic fermentation, 500 mL of sterile liquid effluent with 5 mL of non sterile effluent was placed in a bioreactor. Samples were taken in different hours, and aliquots of the 0,1 mL were striated on the culture media, *Violet Red Bile Agar* (incubated at 35 °C), *Plate Count Agar*, and on minimum medium of HAAS (incubated at 30 °C). After growth, colonies were selected and striated again to obtain isolates. These isolates were cultivated in BHI broth (*Brain Heart Infusion Broth*) to increase cell mass. A total of 5 repetitions were made, with the cellulose concentrations varying between 0%, 0,5%, 1%, 1,5% and 2%, in replicated (favor verificar se está condizente com o resumo em português, pra mim, há uma pequena divergência nesse trecho). Thirty isolates were obtained, being 10 Gram positive bacillus, 11 Gram negative bacillus, 6 Gram positive cocci and 3 yeasts. Among the bacteria isolates, 9 presented motility and 18 were non. For the test of carbohydrates degradation none of the Gram negative bacteria consumed lactose. In the enzymatic test, 1 bacteria exhibited cellulolytic and xylanolytic

potential and 1 showed only xylanolytic activity, suggesting “or indicating” that in dairy cattle effluent there is a microbiota that has potential for hydrolyzing cellulose and xylan.

**Keywords:** bioprospecting, cellulase, waste, xylanase.

## Introdução

No Campo Experimental José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco, MG, a limpeza dos estábulos (*free stall*), é feita com o reuso da água, ou seja, a água uma vez utilizada na lavagem passa por uma peneira rotativa que filtra o líquido (reaproveitado para a próxima limpeza), separando-o das partículas sólidas (refiltradas e descartadas). Em sistemas de manejo de dejetos, quase todas as vias metabólicas podem estar presentes nos processos biológicos deste efluente, o que pode ampliar o leque de microrganismos com atividade hidrolítica para celulose e/ou xilana (VON SPERLING, 2006), biopolímeros com grande importância na produção de etanol de segunda geração, o primeiro por ser fonte de carbono para a fermentação, após ser hidrolisado por celulases e o segundo por oferecer proteção às fibras de celulose contra as celulases (BENEDETTI, et. al, 2009; MELO, 2010).

Microrganismos que degradam celulose possuem um sistema chamado celossoma, constituído por enzimas como a celulase, endoglucanase, exoglucanase e xilanase, altamente organizado, que possibilita a hidrólise do material vegetal com extrema eficiência (XIMENES & FELIZ, 2003).

O uso da celulose para a produção de etanol de segunda geração tem como barreiras o custo e a tecnologia de produção das enzimas, assim, o objetivo deste trabalho foi prospectar microrganismos potencialmente celulolítico e/ou xilanolíticos presentes em efluente da limpeza dos pisos de estábulos, tipo *free stall*, determinando suas características bioquímicas e morfológicas.

## Material e Métodos

A coleta foi realizada no Campo Experimental José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco, MG, o substrato (500 mL) foi coletado em Erlenmeyer estéril a partir do efluente filtrado (líquido, sem partículas sólidas) e o inóculo (5 mL) foi coletado, também, em Erlenmeyer estéril, porém a partir do efluente com partículas sólidas. O transporte do material de Coronel Pacheco até o Laboratório de Microbiologia Rúmem, localizado na sede da Embrapa, em Juiz de Fora, MG, foi realizado em uma caixa térmica. A fermentação aeróbica submersa foi feita em biorreator da Marca *New Brunswick Scientific*, Modelo BioFlo 110®, operado sob agitação de 200 rpm e a temperatura ambiente (+/- 25 °C). O substrato e o inóculo fermentaram por 96 horas, sendo realizadas 9 coletas em tempos diferentes, em cada, após a diluição em série em solução salina 0,9% até  $10^{-7}/10^{-8}$ , alíquotas de 0,1 mL foi estriada nos meios *Violet Red Bile Agar* (incubadas a 35 °C), *Plate Count Agar* (incubadas a 30 °C) e no meio mínimo de HAAS (incubadas a 30 °C) com 1% de carboximetilcelulose (HAAS, 1992). Após 24 horas foram selecionadas colônias de bactérias com morfologias diferentes e estriadas para isolamento. Após o crescimento, as colônias isoladas foram estriadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*) para obtenção de massa celular. Foram realizados 5 experimentos semelhantes a este, com a concentração de celulose variando em 0%, 0,5%, 1%, 1,5% e 2%, em replicada. Os isolados obtidos foram avaliados quanto à pureza, de acordo com o método de Coloração de Gram, quanto à motilidade, utilizando-se o meio SIM, quanto ao consumo de carboidratos (lactose, sacarose e glicose), através do meio *Triple Sugar Iron Agar* (TSI) e quanto ao seu potencial em degradar Carboximetilcelulose (CMC) e xilana, aplicando-se o teste enzimático. Neste método utilizou-se o meio Napl 50 mM, pH 7 + CMC 0,5% (1 g de CMC; 3 g de Agar; qsp 200 mL de NaPl 50 mM em pH 7; 0,1 mL de  $MgCl_2$  1M e 0,1 mL de  $CaCl_2$  1 M) para a detecção da atividade celulolítica. Nas placas com meio já solidificado foram perfurados orifícios para inoculação das amostras (extrato e sobrenadante), obtidos da cultura pura e do controle positivo (bacilo Gram negativo), após centrifugação a 8000 rpm/15 min. Em cada orifício foram colocados 0,1 mL do sobrenadante da cultura pura (teste) e 0,1 mL do precipitado da cultura pura (teste) e do controle positivo. As placas foram incubadas a 30 °C por 20 horas, após o

crescimento as placas foram lavadas com água destilada, coradas com vermelho congo a 0,1% por 10 minutos e lavadas, novamente, com NaCl 1 M para revelação do halo de degradação de CMC. Foram realizadas fotos no transluminador de luz UV Eagle Eye® II (Stratagene). Para a atividade xilanólítica utilizou-se a mesma técnica e procedimento, porém substituindo-se a carboximetilcelulose por de xilana 1%.

## Resultados e Discussão

Foram obtidos 30 isolados. Quanto à morfologia testada pelo método de Coloração de Gram, 10 foram bacilos Gram positivos (BGP), 11 bacilos Gram negativos (BGN), 6 cocos Gram positivos (CGP) e 3 leveduras. Quanto ao teste de motilidade, 9 foram móveis e 18 não móveis. O teste de consumo de carboidratos mostrou que nenhum dos BGN testados degrada lactose. Quanto ao teste enzimático, houve formação de halo relativo a hidrólise da CMC em 1 microrganismos e para xilana em 2 microrganismos, sendo que, um mesmo microrganismo apresentou atividade tanto para celulase quanto para xilanase. O trabalho de Sales et al. (2010) mostrou a variação na produção de celulase pode ocorrer devido a influência da temperatura, pH, concentração do inóculo, tempo de cultivo e agitação. Para a xilanase, Sales et al. (2010) mostraram que pode ocorrer variação na produção devido ao tipo de substrato utilizado. Gautam et al. (2010), mostraram em seu trabalho a produção de celulase por *Pseudomonas* sp., gênero de bactérias Gram negativas e aeróbias.

## Conclusões

O efluente da limpeza de pisos da bovinocultura leiteira possui na sua microbiota microrganismos com potencial biotecnológico. Estudos mais avançados de identificação genética destes isolados deverão ser realizados para revelar qual tipo de celulose/xilana esse microrganismo degrada, para sua classificação e para comprovação da expressão das enzimas alvo. O ganho tecnológico possível com este achado está em poder trabalhar com estes organismos em temperatura ambiente e aerobiose, o que pode facilitar industrialmente a produção de enzimas para a produção de etanol de segunda geração.

## Agradecimentos

À Embrapa Gado de Leite por possibilitar meu enriquecimento acadêmico e a toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Rúmen. À Fapemig e Embrapa pelo financiamento do projeto.

## Literatura citada

GAUTAM, S. P.; BUNDELA, P. S.; PANDEY, A. K.; JAMALUDDIN; AWASTHI, M. K.; SARSAIYA, S. Cellulase production by *Pseudomonas* sp. isolated from municipal solid waste compost. **International Journal of Academic Research**, v. 2, n. 6, p. 1-7, 2010.

HAAS, H.; HERFURTH, E.; STOFFLER, G.; REDL, B. Purification, characterization and partial amino acid sequences of a xylanase produced by *Penicillium chrysogenum*. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1117, n. 3, p. 279-286, oct. 1992.

SALES, M. R. et al. Variáveis que influenciam a produção de celulasas e xilanases por espécies de *Aspergillus*. **Pesq. agropec. bras.**, Brasília, v. 45, n. 11, p. 1290-1296, nov. 2010.

MELO, G. R. **Produção de Celulasas e Xilanases pelo fungo termófilo *Humicola grisea* var. *thermoidea* em diferentes substratos lignocelulósicos**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Celular) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

VON SPERLING, M. **Princípios do tratamento biológico de águas residuárias: Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3. ed. Belo Horizonte: UFMG, 2006. v.1, 452p.

XIMENES, E. A; FELIX, C. R. O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios: uma mini-revisão sobre o celulosoma. **Universitas Ciências da Saúde**, v. 1, n. 2, p. 335-341, 2008.



# **Influência da cobertura vegetal na qualidade da água no entorno do Parque Estadual do Ibitipoca e do Parque Estadual do Papagaio em Minas Gerais**

## **Influence of vegetation on water quality surrounding the “Ibitipoca” State Park and “Papagaio” State Park in Minas Gerais**

Gabriele Medeiros dos Santos<sup>1</sup>, Marcelo Henrique Otenio<sup>2</sup>, Marcos Ciccarini Hott<sup>3</sup>, Maria Leonor Ribeiro Casimiro Lopes Assad<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte da Monografia de conclusão de curso de Geografia - UFJF

<sup>1</sup>Mestranda em Agroecologia e Desenvolvimento Rural – Universidade Federal de São Carlos

<sup>2, 3</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite – marcelo.otenio@embrapa.br; marcos.hott@embrapa.br

<sup>4</sup>Professora Associada, Bolsista CNPq; Departamento de Recursos Naturais e Proteção Ambiental Centro de Ciências Agrárias - CCA; Universidade Federal de São Carlos - assad@cca.ufscar.br

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi verificar a influência da cobertura do solo na qualidade da água em municípios mineiros no Corredor Ecológico da Mantiqueira. A partir de pontos selecionados e georreferenciados, amostras de água foram coletadas e analisadas, conforme parâmetros da resolução Conama 357/2005 para a qualidade de água permitindo então a classificação dos corpos hídricos. Foi também avaliada a cobertura vegetal, a partir do geoprocessamento de imagens SPOT de alta resolução. Em alguns pontos, a cobertura vegetal é escassa, em função das atividades produtivas, e não é capaz de exercer seu papel de contenção da erosão e filtro para contaminantes. Os resultados mostraram que três pontos mudaram de classe hídrica 2 para 3, na estação chuvosa, voltando a ser classe 2 na época seca. Isto indica que o modelo atual de desenvolvimento agrícola tem como possíveis consequências a contaminação e degradação de solos e águas, redução da biodiversidade, e desequilíbrios ecológicos, levando por fim à insustentabilidade dos sistemas de produção agropecuária.

**Palavras-chave:** recursos hídricos, geoprocessamento, desenvolvimento rural.

**Abstract:** The objective of this study was to investigate the influence of land cover on water quality in towns in Ecological Corridor “Mantiqueira”. From selected georeferenced hot-spots water samples were collected and analyzed in accordance with the parameters adopted by CONAMA Resolution 357/2005 for the quality water thus allowing the classification of hydrous bodies. Satellite images with field work verification were used for the interpretation of vegetation. In some cases little coverage vegetation, according to the productive activities and is not able to exercise their role of curbing erosion and filter for contaminants. The results indicate that the current model of agricultural development has the potential consequences of contamination and degradation of soils and waters, reduction of biodiversity and ecological imbalances, leading ultimately to the unsustainability of agricultural production systems. The continuity of the work should try to assess the attitudes of producers facing the conservation of natural resources, because based on these characteristics will be able to deal with the producers to show more degraded areas and propose actions for conservation of water resources to maintain production and sustainability from agricultural activities.

**Keywords:** water resources, geoprocessing, rural development.

### **Introdução**

A atividade agropecuária pode contribuir para degradação ambiental, particularmente quando praticada em áreas sensíveis.

A qualidade da água de uma microbacia pode ser influenciada por diversos fatores e, dentre eles, estão o clima, a cobertura vegetal, a topografia, a geologia, bem como o tipo, o uso e o manejo do solo da bacia hidrográfica. Segundo Arcova et al. (1998), os vários processos que controlam a qualidade da água de determinado manancial fazem parte de um frágil equilíbrio,

motivo pelo qual alterações de ordem física, química ou climática, na bacia hidrográfica, podem modificar a sua qualidade.

Segundo Tundisi (1999), alterações na quantidade, distribuição e qualidade dos recursos hídricos ameaçam a sobrevivência humana e as demais espécies, estando o desenvolvimento econômico e social dos países fundamentados na disponibilidade de água de boa qualidade e na capacidade de sua conservação e proteção.

Neste sentido, o planejamento e gestão de bacias hidrográficas estão sendo cada vez mais alvo de pesquisas. O monitoramento ambiental, em bacias hidrográficas, procura caracterizar aspectos relevantes que permitam diagnosticar as mudanças que ocorrem no uso e cobertura do solo, tornando possível avaliar os efeitos das atividades humanas exercidas nas bacias hidrográficas sobre os ecossistemas. Por isso, é indicado monitorar variáveis ambientais que sejam sensíveis às mudanças que possam vir a ocorrer. O conhecimento sobre a qualidade dos cursos d'água de uma bacia pode fornecer informações sobre as condições da bacia hidrográfica como um todo. Sendo assim, tendo-se uma bacia hidrográfica como área de estudo, os resultados apresentam melhor fundamentação e aplicabilidade, devido a essa conter informações físicas, biológicas, socioeconômicas e, inclusive, culturais da população que ali se estabelece.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade da água em propriedades rurais leiteiras da região do Corredor Ecológico da Mantiqueira em função da exploração agropecuária e evidenciar a adoção dos princípios de sustentabilidade.

## **Material e Métodos**

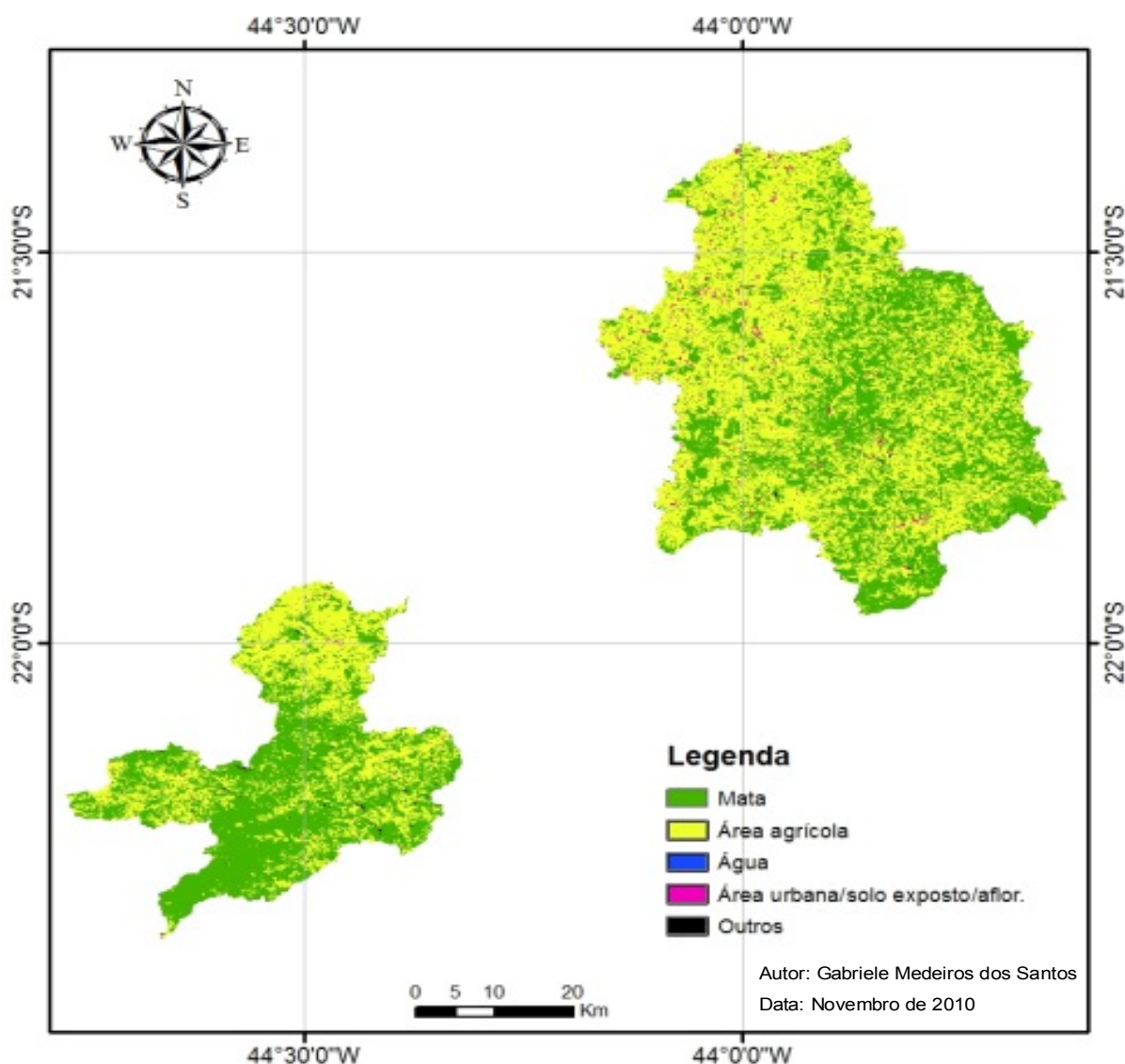
Os municípios estudados fazem parte da porção sudeste do Estado de Minas Gerais e estão distribuídos entre a Bacia hidrográfica do Alto Rio Grande e a Bacia hidrográfica do Médio Paraíba do Sul. Para este estudo, foram selecionadas 16 comunidades, em nove municípios (Lima Duarte, Santana do Garambéu, Santa Rita de Ibitipoca, Pedro Teixeira, Ibertioga, Carvalhos, Bocaina de Minas, Alagoa) que têm a produção de leite em pequenas propriedades como principal atividade geradora de emprego e renda, além do Quilombola Colônia do Paiol, no município de Bías Fortes. Dos nove municípios selecionados, sete estão no entorno do Parque Estadual de Ibitipoca e os outros estão no Núcleo Mantiqueira II do Corredor Ecológico da Mantiqueira. Inicialmente, foi feita a escolha dos pontos para coleta de amostras de água. Nesses pontos, foi feito o georreferenciamento, por meio de Sistema Global de Posicionamento por Satélite (GPS) GARMIN®, modelo Etrex Legend HCx. Nos cursos lóticos (rios e córregos) foram determinados pH, turbidez, oxigênio dissolvido, fosfato, amônia, ferro, cloreto, dureza, temperatura, por meio do Ecokit®; nitrato e nitrito, por meio do Cardkit®; e coliforme fecal, coliforme total e Salmonella, por meio do Tecnobac®, de acordo com Resolução Conama 357 (BRASIL, 2005). Foram feitas duas séries de coletas: uma na época chuvosa (verão) e outra na época seca (inverno). Para validação dos resultados obtidos com o uso do Ecokit®, cada ponto de amostragem foi visitado e, por meio de uma sonda multiparâmetros (HANNA®, modelo HI 9828), foram feitas leituras de temperatura, oxigênio dissolvido, e pH.

Foram utilizados o software ArcGis® 9.3, duas imagens provenientes do satélite Landsat 5 obtidas gratuitamente no site do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais – INPE, correspondentes às órbitas/ponto 217/75 e 218/75 e imagens/extratos de mosaico SPOTMAP, de resolução 2,5 m. Na interpretação das imagens, foram feitas análises de sombra, nuvem, área agrícola, área urbana, hidrografia e vegetação, para correlacionar com o índice de contaminação/poluição do ambiente. A identificação expedita das classes de cobertura foi feita por Classificação Supervisionada pelo método da Máxima Verossimilhança, gerando-se um mapa temático com as classes Área urbana/ Solo exposto/afioramento, Área agrícola, Mata, Água e Outros. Foi utilizado o Modelo Digital de Elevação (MDE) que possibilitou, com os refinamentos adequados, o cruzamento dos dados da classificação de uso do solo, com o resultado das análises de água coletadas e a rede de drenagem da região. Em função da escala final do trabalho (1:250.000), a utilização dos dados SRTM mostrou-se suficiente para suprir as necessidades de análise das características hidrológicas da região.

## Resultados e Discussão

O mapa de uso do solo (Figura 1) apontou a predominância de áreas de mata e agrícolas.

### Uso Cobertura do Solo



**Figura 1.** Mapa temático de uso e cobertura do solo nas áreas de interesse do estudo.

Os resultados obtidos (Tabelas 1 e 2) confirmam que em áreas de produção de leite de base familiar, a poluição ocorre de forma difusa e com pequenas variações entre a presença ou ausência de salmonela, o que indica a contaminação deste ponto com fezes humanas ou animais.

**Tabela 1.** Média das variáveis analisadas e classificação da água, por ponto, na época da seca, período de 20/06/2009 a 26/09/2009.

Parâmetros/Ponto	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
<b>Coliforme fecal</b> (UFC/100mL)	465	943	435	210	640	330	840	480	648	1120	37420	599,5	326	493	1260	840	645
<b>Coliforme total</b> (UFC/100mL)	1335	1621	29760	780	1403	840	18180	1320	5425	3280	8653	40860	16437	8355	15360	4846	1415
<b>Salmonela</b> (UFC/100mL)	0	0	0	0	500	90	270	253	0	0	0	0	0	0	210	177	720
<b>Oxigênio dissolvido</b> (mg L <sup>-1</sup> O <sub>2</sub> )	8,6	6,6	8,8	8,8	7,3	9,1	6,3	7,8	7	9,8	9,9	6,8	8,9	14,3	9,3	8,1	6
<b>Temperatura ar</b> (°C)	23,5	19,5	19,7	19,4	23,8	23	23	17,2	21,1	19,1	22	18,8	21,1	21,1	14,4	25,7	14,1
<b>Temperatura água</b> (°C)	19,8	15,8	16,4	16,4	18,1	18	18,8	17,7	15,8	16	17,1	12,6	18,8	18,7	13,4	14,8	12,5
<b>Dureza total</b> (mg L <sup>-1</sup> CaCO <sub>3</sub> )	76	41	66,8	36,5	67	22	47,2	85,1	40	56,8	103,6	47,5	60,8	46,5	54,2	42,2	58,5
<b>Cloretos</b> (mg L <sup>-1</sup> Cl)	45,5	50	47,4	21,5	50	37	38	72	60,5	38,5	78	39,5	32	16,5	40,5	46,8	60,5
<b>pH</b>	5,9	6,4	6,5	6,3	5,6	6,4	6,6	6,7	6,7	6,5	6,5	6,5	6,4	6,2	6,7	6,9	6,3
<b>Turbidez</b> (NTU)	50	56,2	85,7	56,2	50	50	50	100	50	50	50	50	57,1	27,5	42,8	50	50
<b>Amônia</b> (mg L <sup>-1</sup> N-NH <sub>3</sub> )	0,4	0,1	1,4	0,12	0,5	0,1	0,3	0,1	0,09	0	0	0,1	0,1	0,5	0,3	0,1	0,5
<b>Ferro</b> (mg L <sup>-1</sup> Fe <sub>2</sub> )	0,06	0,06	0,1	0	0,4	0,2	0,4	0	0,1	0,2	0	0,1	0	0	0,03	0	0
<b>Ortofosfato</b> (mgL <sup>-1</sup> PO <sub>4</sub> )	0	0,1	0	0,02	1,3	0	0	0	0,1	0	0	0,1	0	0	0	0	0
<b>Fósforo</b> (mgL <sup>-1</sup> PO <sub>4</sub> )	0	0,03	0	0,04	0,2	0	0	0	0,03	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Nitrato</b> (mgL <sup>-1</sup> N-NO <sub>3</sub> )	1,05	0,3	0,6	0,4	0,6	0,4	0,5	0,1	0,7	0,4	0	0,4	0,4	0,2	0,4	0,3	0
<b>Nitrito</b> (mgL <sup>-1</sup> N-NO <sub>2</sub> )	0,02	0,03	0,02	0,03	0,03	0	0,06	0,09	0,04	0,02	0	0,1	0,03	0,01	0	0,04	0
<b>Classificação</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	3	2	2

De maneira geral, os parâmetros ambientais medidos possuíam valores típicos de ambientes com ação antrópica difusa. As fontes difusas, por se tratarem de impurezas, possuem uma dispersão maior no corpo hídrico, dificultando a quantificação e a caracterização das fontes poluidoras (SOTORIVA E GARCIAS, 2011). Os valores elevados de coliformes fecais indicam contaminação por lançamentos de esgoto e, conseqüentemente presença de microrganismos patogênicos (SILVA E ARAÚJO, 2003). A presença de coliformes fecais (Tabelas 1 e 2), quando relacionada com as imagens geradas (Figura 1), mostra que os pontos (3, 7 e 17), por exemplo, no período seco são classificados, conforme a resolução Conama, como classe 2 e no período chuvoso como classe 3. Isto ocorre, levando-se em conta todos os parâmetros de análise de água utilizados para classificar o corpo hídrico, principalmente pelo aumento na contagem de bactérias do tipo coliformes fecais. O aumento do volume de água disponível no solo possibilita a chegada destas bactérias ao curso d'água, via enxurrada, quase sempre, pela ausência de cobertura vegetal. Este parâmetro ganha importância na avaliação destes pontos e é o foco das ações que deverão ser tomadas para melhoria da qualidade ambiental destes locais.

**Tabela 2.** Média das variáveis analisadas e classificação da água, por ponto, na época da chuva, período de 10/10/2009 a 23/03/2010.

[illegible]

Os resultados permitem afirmar que, comparativamente, nos pontos onde a cobertura vegetal não foi totalmente removida o corpo hídrico foi aquele que apresentou melhor qualidade de água e preservação ambiental, baseando-se no indicador de classificação do corpo hídrico (BRASIL, 2005). Quando o solo apresenta cobertura vegetal sua presença permite uma melhor absorção de águas pelo solo reduzindo as enxurradas e consequentemente diminuindo a possibilidade de erosão (BERTOL et al., 2010). Ações de saneamento ambiental e de recomposição de mata ciliar e de cobertura vegetal de topos de morro tem se mostrado eficazes para manutenção e recuperação da qualidade da água de recursos hídricos impactados pela ação antrópica (PILATTI, 2008).

## **Conclusões**

A cobertura vegetal mais íntegra impede a formação de enxurrada sobre o solo, diminuindo o carreamento de restos de cultivo e assoreamento dos rios e córregos. Além disto, a alteração da classe hídrica dos rios avaliados ocorrem em função do tipo de exploração do solo da região.

## **Agradecimentos**

À Fapemig

## **Literatura citada**

ARCOVA, F. C. S.; CESAR, S. F.; CICCIO, V. Qualidade da água em microbacias recobertas por floresta de Mata Atlântica, Cunha, São Paulo. **Revista do Instituto Florestal de São Paulo**, São Paulo, v. 10, n. 2, p. 185-96, 1998.

BERTOL, I.; VÁZQUEZ, E. V.; GONZÁLEZ, A. P.; COGO, N. P.; LUCIAN, R. V.; FABIAN, E. L. Sedimentos transportados pela enxurrada em eventos de erosão hídrica em um Nitossolo Háplico. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, v. 34, n. 1, p. 245-252, 2010.

BRASIL. (2005). Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357, 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento. **Diário Oficial da União, local, data da publicação**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2012.

PILATTI, F.; HINSCHING, M. A. O. **Saneamento Básico Rural na Bacia Hidrográfica do Manancial Alagados**. Ponta Grossa, PR: UEPG/SANEPAR, 2008.

SILVA, R. C. A.; ARAUJO, T. M. de. Qualidade da água do manancial subterrâneo em áreas urbanas de Feira de Santana (BA). **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 8 n. 4, p. 1019-1028, 2003.

SOTTORIVA, E. M.; GARCIAS, C. M. Poluição difusa urbana por compostos inorgânicos: avaliação da contribuição dos componentes do amianto presente nas telhas de fibrocimento e nos freios de veículos. **Ambiente Construído**, v. 11, n. 3, p. 89-97, 2011.

TUNDISI, J. G. **Limnologia do século XXI: perspectivas e desafios**. São Carlos: Suprema Gráfica e Editora, IIE, 1999. 24 p.

# **Prospecção de bactérias xilanolíticas e celulolíticas no conteúdo ruminal de vacas secas**

## **Prospection of xylanolytic and cellulolytic bacteria from the ruminal content of dry cows**

Renata da Costa Barros Silva<sup>1</sup>, Lorena Evangelista Fernandes<sup>2</sup>, Camila Branda dos Reis<sup>2</sup>, Ana Luiza de Moura Carmo<sup>2</sup>, Ludmila de Souza da Caputo Valente<sup>3</sup>, Mayara Souza Breder Valente<sup>3</sup>, Junior César Fernandes<sup>4</sup>, Marlice Teixeira Ribeiro<sup>4</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>4</sup>, Cláudio Gallupo Diniz<sup>5</sup>, Marcelo Henrique Otenio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte da dissertação de mestrado da primeira autora, financiada pela Capes

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora- CES/JF

<sup>3</sup>Graduanda em Farmácia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - Suprema

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite

<sup>5</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora

**Resumo:** Ruminantes são animais capazes de utilizar a fibra dos vegetais como alimento devido à atuação de microrganismos presentes em seu trato digestivo. A prospecção por bactérias da microbiota ruminal com potencial capacidade de degradação de celulose e xilana tem importância no desenvolvimento de biocombustíveis de segunda geração. Foram realizadas coletas de conteúdo ruminal de vacas secas fistuladas para posterior isolamento de bactérias e avaliação quanto a sua pureza, motilidade, tolerância ao oxigênio e perfil enzimático. Foram obtidos 66 isolados, dos quais 23 foram cocos Gram positivos, 26 cocobacilos Gram positivos, oito bacilos Gram negativos e nove Gram positivos. O resultado do teste respiratório indicou que 16 foram anaeróbios estritos e 14 apresentaram motilidade positiva. Os zimogramas mostraram que dos isolados 14 eram celulolíticos e 65 xilanolíticos. A maioria dos isolados apresentou atividade enzimática para celulase, xilanase ou para ambas, indicando serem potenciais fontes de degradação de biomassa, com possível aplicabilidade biotecnológica.

**Palavras-chave:** biocombustível, biotecnologia, celulose, xilana, ruminante.

**Abstract:** The ruminants are animals capable of using the vegetable fiber as food due to role the microorganisms play in their digestive tract. The prospection for rumen microorganisms with potential cellulose and xylan degradation habilities is of great importance, helping the development of second generation biofuels. Ruminal content was collected from fistulated dry cows for later bacteria isolation and evaluation regarding purity, motility, tolerance to oxygen and enzymatic profile. During this research 66 isolates were obtained, from which 23 were Gram positive cocci, 26 Gram positive coccobacilli, eight Gram negative rods and nine Gram positive. The respiratory test results indicated that 16 were strict anaerobes and 14 were motile. The zymmograms indicated that 14 were cellulolytics and 65 were xylanolytic. Most of the isolates presented enzymatic activity for cellulose, xylanase or both, indicating a source of biomass degradation, with possible biotechnological applicability.

**Keywords:** biofuel, biotechnology, cellulose, ruminant, xylan.

### **Introdução**

Os vegetais possuem uma variedade de polissacarídeos estruturais ou de armazenamento. A celulose representa a maioria desses polissacarídeos, sendo uma das fontes naturais renováveis mais abundantes na natureza (SCHWARZ, 2001). A utilização desse polissacarídeo na indústria de bioenergia representa importante passo para o desenvolvimento sustentável. Para sua conversão em álcool etílico, os materiais

lignocelulósicos são biodegradados pela ação de enzimas extracelulares produzidas por determinados microrganismos e, portanto, o desenvolvimento de técnicas e processos biotecnológicos que otimizem essa conversão é relevante para a indústria.

A presença dos microrganismos no sistema digestório dos ruminantes possibilita que esses animais utilizem a parede celular dos alimentos volumosos e o nitrogênio não proteico em sua nutrição. Haja vista que grande parte da biomassa vegetal ser constituída principalmente de lignina, celulose e hemicelulose a utilização efetiva desses compostos está diretamente relacionada ao desenvolvimento de metodologias que permitam a hidrólise e solubilização de tais compostos (XIMENES et al., 2003).

A degradação da celulose e da xilana em ruminantes alimentados com dietas baseadas majoritariamente em vegetais lignocelulósicos é feita com o auxílio de microrganismos presentes em seu trato digestivo, que são capazes de hidrolisar a fibra vegetal para obter os açúcares presentes na biomassa. O isolamento de microrganismos com potencial celulolítico e/ou xilanolítico tem como principal potencial biotecnológico a produção de etanol de segunda geração.

O objetivo deste trabalho foi prospectar microrganismos com potencial celulolítico e xilanolítico oriundos do rúmen de bovinos alimentados com dietas ricas em fibra vegetal.

## Material e Métodos

No estudo foram utilizadas vacas secas fistuladas no rúmen. A manutenção dos animais foi realizada no Campo Experimental José Henrique Bruschi (Coronel Pacheco – MG) de propriedade da Embrapa Gado de Leite, em diferentes dietas à base de cana de açúcar com suplementação de 1 kg de concentrado com 22% de proteína bruta, silagem de milho acrescida de glicerina e pastagem (*Brachiaria decubens*) sem suplementação.

As coletas de conteúdo ruminal foram realizadas semanalmente de forma manual e armazenadas em garrafas térmicas para posterior transporte para o Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite, localizado em Juiz de Fora, MG.

O cultivo dos microrganismos foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por Hungate (1966). Para o isolamento, o líquido ruminal foi diluído até  $10^{-4}$  e inoculado em meio completo. Após período de 24 horas, o meio foi diluído até  $10^{-10}$  e inoculado em *rolltubes*. Foram selecionadas colônias, que foram transferidas para meio completo e avaliadas quanto à motilidade (meio SIM), pureza, teste respiratório (tolerância a oxigênio/câmara anaeróbica) e coloração de Gram. O potencial em degradar carboximetilcelulose (CMC) e xilana, foi avaliado aplicando-se zimogramas (TEATHER & WOOD, 1981). Neste método utilizou-se o meio Napl 50 mM, pH 7 + CMC 0,5% (1 g de CMC; 3 g de Agar; qsp 200 mL de NaPI 50 mM em pH 7; 0,1 mL de  $MgCl_2$  1 M e 0,1 mL de  $CaCl_2$  1 M) para a detecção da atividade celulolítica. Nas placas com meio já solidificado foram perfurados orifícios para inoculação das amostras (extrato e sobrenadante), obtidos da cultura pura e do controle positivo para a degradação de carboximetilcelulose, após centrifugação a 14 000 x g/15min. Em cada orifício foram colocados 0,1mL do sobrenadante da cultura pura (teste) e do controle positivo. As placas foram incubadas a 30°C por 20 horas. Após incubação as placas foram lavadas com água destilada, coradas com vermelho congo a 0,1% por 10 minutos e lavadas, novamente, com NaCl 1M para revelação de halo. Foram realizadas fotos em transluminador de luz UV. Para a atividade xilanolítica utilizou-se o mesmo meio e procedimento, porém substituindo-se a carboximetilcelulose por xilana 1% (TEATHER & WOOD, 1981).

Uma vez caracterizados, os isolados foram acondicionados em freezer -20 °C para caracterização molecular e posterior inclusão na coleção de microrganismos da Embrapa.

## Resultados e Discussão

No total foram obtidos 66 isolados, sendo destes 23 cocos Gram positivos, 26 coccobacilos Gram positivos, oito bacilos Gram negativos e nove bacilos Gram positivos. Esse resultado está de acordo com Wilson et al. (1955), que relataram haver predominância de cocos e bacilos Gram positivos na microbiota ruminal. O teste de

motilidade revelou que apenas 14 dos 66 isolados eram móveis e no teste respiratório observou-se que 16 eram anaeróbios estritos.

Os zimogramas demonstraram que 14 isolados eram celulolíticos e 65 xilanolíticos. A xilana e a celulose são os dois polímeros de carboidratos mais abundantes na biomassa lignocelulósica e sua degradação é de grande interesse para o tratamento de dejetos, a produção de biocombustíveis, a digestão no rúmen e a indústria de papel (MACKENZIE et al., 1987). No entanto, a utilização desses compostos tem como barreira o alto custo de produção dessas enzimas, o que torna necessário a redução de custos ou o melhoramento de sua atividade de forma a tornar o processo mais eficiente e acessível. Assim este estudo contribui substancialmente para mitigar os desafios enfrentados na produção de derivados de fibra vegetal

## **Conclusões**

O experimento realizado mostra que a maioria dos isolados apresentou atividade enzimática para celulase, xilanase ou para ambas.

Os resultados obtidos nesse trabalho são de grande importância, uma vez que representam um possível ganho tecnológico e econômico no processo de obtenção, caracterização e posterior produção industrial de xilanases e celulases

A caracterização molecular, próxima etapa desse trabalho, é ferramenta importante para a identificação das espécies isoladas, de forma a consolidar os resultados aqui obtidos.

## **Agradecimentos**

À Capes, à Fapemig e à Embrapa pelo suporte financeiro e apoio a este trabalho.

## **Literatura citada**

HUNGATE, R. E. 1966. The Rumen and its Microbes. **Académie Press, New York and London**. 9-90.

MACKENZIE R. C.; BILOUS D.; SCHNEIDER H.; JOHNSON K. G. 1987. Induction of Cellulolytic and Xylanolytic Enzyme Systems in Streptomyces. **Enzyme**, **53**: 2835-2839

SCHWARZ, W. H. 2001. The cellosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 56: 634–649.

TEATHER, R. M.; WOOD, P. J. 1981. Use of Congo Red-Polysaccharide Interactions in Enumeration and Characterization of Cellulolytic Bacteria from the Bovine Rumen. **Applied and Environmental Microbiology**, **43**: 4.

WILSON, M. K.; BRIGGS, C. A. E. 1955. The Normal Flora of the Bovine Rumen II: Quantitative Bacteriological Studies. **Journal of Applied Microbiology**. 18: 294-306.

XIMENES, E. A.; FELIX, C. R. 2003. O sistema celulolítico de microrganismos anaeróbios: uma mini-revisão sobre o celulosoma. **Universitas Ciências da Saúde**. 1: 335-341.



# **Avaliação da produção de biogás a partir de dejetos da pecuária leiteira em biodigestor escala laboratorial**

## **Evaluation of biogas production from dairy cattle manure obtained with laboratorial biodigester**

Samuel de Oliveira Fortunato<sup>2</sup>, Juliana Alves Resende<sup>3</sup>, Tamara Lopes Rocha de Oliveira<sup>4</sup>, Ernando Ferreira Motta<sup>5</sup>, Júnior César Fernandes<sup>5</sup>, Marlice Teixeira Ribeiro<sup>5</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>5</sup>, Marcelo Henrique Otenio<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Parte dos resultados de experimento da tese de doutorado da segunda autora, financiado pela Capes, CNPq, Fapemig e Embrapa

<sup>2</sup> Graduando de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Bolsista de Apoio Técnico em Extensão, Embrapa Gado de Leite. e-mail: samuel90@gmail.com

<sup>3</sup> Doutorado do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFJF/Juiz de Fora – Bolsista da Capes. e-mail: juresende2003@yahoo.com.br

<sup>4</sup> Graduando de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Bolsista do CNPq. e-mail: tamarinhalopes@hotmail.com

<sup>5</sup> Embrapa Gado de Leite. e-mail: ernando.motta@embrapa.br; junior.lima@embrapa.br; marlice.ribeiro@embrapa.br, jailton.carneiro@embrapa.br, marcelo.otenio@embrapa.br

**Resumo:** O presente trabalho avaliou a produção de biogás a partir da biodigestão anaeróbia de dejetos da bovinocultura leiteira. O sistema de tratamento foi composto por dois biodigestores de bancada, instalados no laboratório de Resíduos – Embrapa Gado de Leite. O sistema foi operado com tempo de retenção hidráulica de 45 dias e carga máxima média útil de 57 L para o abastecimento inicial (1<sup>a</sup> dia). Entre o 15<sup>a</sup> e 45<sup>a</sup> dia foram realizadas cargas diárias de 2 L acompanhadas de saídas automáticas de efluente com igual volume por um sistema de sifão. O substrato utilizado foi composto por uma mistura de dejetos bovinos e água de lavagem dos pisos (água de reuso) com teor de sólidos entre 2 e 3%. Foram avaliados nessas condições, a produção individual e média dos biodigestores, a distribuição da produção ao longo do tempo, os teores e as reduções dos sólidos totais, a produção de metano e a qualidade do gás. Concluiu-se que a biodigestão anaeróbia, nas condições avaliadas, produziu elevados níveis de metano, com índice crescente ao longo do tempo, e que as cargas diárias mantêm o processo contínuo de produção de biogás.

**Palavras-chave:** biodigestão anaeróbia, dejetos bovinos, metano, sólidos totais.

**Abstract:** This study evaluated the production of biogas from the anaerobic digestion of dairy cattle manure. The treatment system was based in two laboratorial biodigesters, installed in the laboratory of Residues - Embrapa Dairy Cattle. The system was operated with hydraulic retention time of 45 days. The mean maximum useful load was 57 L for the initial load (1<sup>st</sup> day). From day 15 to day 45 daily volume of 2 L were loaded and after each supply an equal volume of effluent was automatically expelled through a syphon system. The basic substrate was composed of a mixture of reusable wash-floor water and cattle waste, with the total solids concentration between 2 and 3%. The average and total production of biodigesters, the production distribution over time, as well as the level and reduction of total solids, the production and methane concentration in the biogas were measured. It was concluded that the anaerobic biodigestion, under the conditions evaluated, produced high levels of methane increasing over time and that the daily loads keeps the continuous process of biogas.

**Keywords:** anaerobic digesters, dairy cattle manure, biogas.

## Introdução

Em sistemas de confinamento de bovinos leiteiros, um volume considerável de dejetos é gerado diariamente. O processo de biodigestão anaeróbica é uma das alternativas utilizadas para o tratamento destes resíduos, pois reduz o potencial poluidor, produz biogás e permite o uso do efluente com biofertilizante (COSTA, 2009).

A utilização do biogás como recurso energético se deve principalmente ao teor de gás metano passível de queima como combustível. Sua queima produz energia e gás carbônico.

A dinâmica de produção de biogás está focada na utilização da matéria orgânica, presente nas fezes dos animais que são utilizadas como substrato pelas bactérias metanogênicas, possibilitando uma concentração de 50 a 80% de metano no volume total de biogás (COLDEBELLA et al., 2006; LA FARGE, 1979).

Considerando-se a importância ambiental e econômica do tratamento de resíduos orgânicos provenientes da bovinocultura leiteira, o objetivo deste trabalho foi avaliar o aproveitamento desses dejetos em biodigestores contínuos de escala de bancada, o potencial para produção de biogás, a distribuição da produção ao longo do tempo bem como a qualidade do metano produzido.

## Material e Métodos

Foram realizados ensaios de biodigestão anaeróbia em 2 biodigestores de escala de bancada com volume útil médio de 57 L, instalados no Laboratório de Resíduos da Embrapa Gado de Leite, operados com tempo de retenção hídrico (TRH) de 45 dias. Os dejetos utilizados no carregamento inicial e nos abastecimentos diários, foram coletados em um dos sistemas de produção de leite do Campo Experimental José Henrique Bruschi, em Coronel Pacheco – MG. Após cada coleta, as fezes eram diluídas com a água de lavagem dos pisos do *free stall* (água de reuso), em quantidade suficiente para que a concentração de sólidos totais no substrato ficar entre 2 e 3%. A partir do 15º dia foram realizadas cargas diárias de 2 L acompanhadas da saída de efluente com esse mesmo volume, automaticamente, através de um sistema de sifão.

Para determinar o início da produção de metano foi feito, diariamente, o teste de queima na saída dos biodigestores.

O volume de biogás produzido diariamente nos biodigestores foi determinado medindo-se o deslocamento vertical (altura) dos gasômetros e multiplicando-se esse valor pela área da seção transversal interna do mesmo (0,049 m<sup>2</sup>). A correção do volume de biogás para as condições de 1 atm e 20 °C, foi efetuada segundo CAETANO (1985).

Após a medida do volume, amostras de gás (0,08 cm<sup>3</sup>) foram coletadas no gasômetro, para determinação do teor de metano (CH<sub>4</sub>), por cromatografia gasosa.

Semanalmente foram retiradas amostras (25 mL) do afluente e dos efluentes de ambos biodigestores, para a determinação dos teores de sólidos totais por secagem em estufa ventilada à 65 °C durante o mínimo de 24 horas ou até obter peso constante (APHA, 2000).

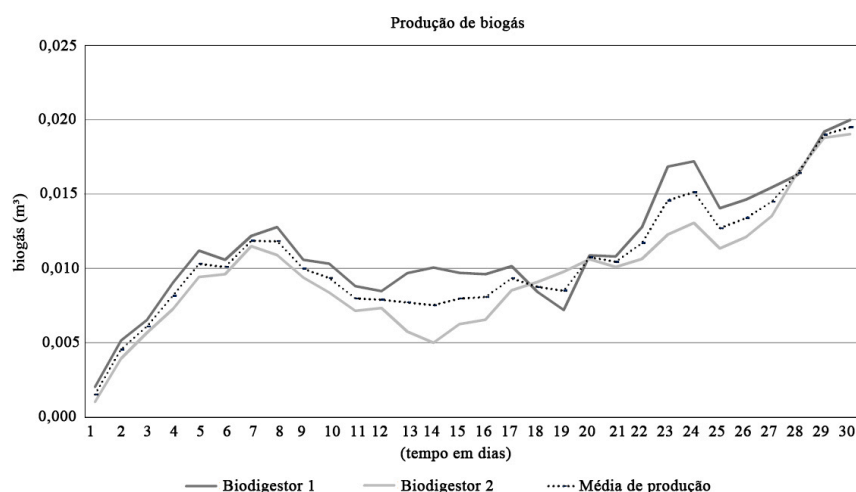
## Resultados e Discussão

O teste da queima mostrou que a produção de biogás iniciou no 15º dia. A partir desse dia os biodigestores foram alimentados diariamente com substrato. A Tabela 1 mostra que a produção de metano aumenta ao longo do tempo. O reabastecimento com cargas diárias propicia a continuidade do processo pela oferta de matéria orgânica e sólidos totais disponíveis para digestão anaeróbia.

**Tabela 1.** Composição média do biogás ao longo do tempo. Média dos dois biodigestores em valores de metano (CH<sub>4</sub>).

Tempo (dias)	CH <sub>4</sub> (%)
0	-
7°	48,83
14°	44,06
21°	63,43
28 <sup>a</sup>	66,22
35°	69,68
42°	71,27

Para produção de biogás (Figura 1) observou-se certa linearidade, com aumento da produção no decorrer do tempo.



**Figura 1.** Produção total de biogás em sistema de biodigestores contínuos a partir do início da produção de metano (teste da queima).

Pelo gráfico, observa-se que 30 dias de avaliação não foram suficientes para estabilizar a produção de biogás. O conhecimento da faixa de maior produção de biogás é uma informação fundamental para o dimensionamento do aproveitamento do biogás gerado.

Os teores de sólidos totais são mostrados na Tabela 2. Observou-se uma redução média de 87,40% dos sólidos totais. Estes valores indicam o consumo da matéria orgânica presente, possivelmente pela atividade das bactérias envolvidas no processo de biodigestão anaeróbica, principalmente.

**Tabela 2.** Teores médios inicial e final e redução percentual de sólidos totais (ST) após o tempo de retenção de 45 dias.

Biodigestor	Inicial (%)	Final (%)	ST reduzidos (%)
1	4,84	0,74	84,71
2	4,64	0,46	90,08
<b>Média</b>	<b>4,74</b>	<b>0,60</b>	<b>87,40</b>

## Conclusões

A biodigestão anaeróbia produz elevados níveis de metano, crescentes ao longo do tempo. As cargas diárias são fundamentais na disponibilização de sólidos totais do sistema.

Para esse tipo de sistema, em escala piloto, são necessários períodos de observação mais longos para determinar a fase de equilíbrio de produção de metano.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura Citada

APHA-AWWA-WPCF. **Standart methods for the examination of water and wastewater**. 20. ed. Washington: American Public Health Association, 2000.

CAETANO, L. **Proposição de um sistema modificado para quantificação de biogás**. 1985. 75 f. Dissertação (Mestrado em Energia na Agricultura) - Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1985.

COLDEBELLA, A.; SOUZA, S. N. M.; SOUZA, J. et al. Viabilidade da cogeração de energia elétrica com biogás da bonivocultura de leite. In: ENCONTRO DE ENERGIA NO MEIO RURAL, 6., 2006, Campinas. **Anais...** Campinas, 2006.

COSTA, L.V.C.; LUCAS JUNIOR, J.; XAVIER, C. A. N.; SILVA, A. A.; MACHADO, C. R. Produção de metano a partir da cama de frango associada ao biofertilizante obtido com estrume de suínos. In: I SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE GERENCIAMENTO DE RESÍDUOS DE ANIMAIS, 2009, Florianópolis. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 2009.

LA FARGE, B. **Le Biogaz: Procèdes de Fermentation Méthanique**. Paris: Masson, 1979.

# **Avaliação quantitativa de grupos bacterianos representativos em sistemas de produção de biogás a partir da digestão anaeróbica de dejetos da pecuária leiteira**

## **The quantitative microbiological analysis of diversity and ecological succession in biogas production system's from dairy cattle manure**

Tamara Lopes Rocha de Oliveira<sup>2</sup>, Juliana Alves Resende<sup>3</sup>, Samuel Fortunato<sup>2</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>4</sup>, Marlice Teixeira Ribeiro<sup>4</sup>, Júnior César Fernandes<sup>4</sup>, Vânia Lúcia da Silva<sup>5</sup>, Cláudio G. Diniz<sup>5</sup>, Marcelo Henrique Otenio<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte de resultado de experimento da tese de doutorado da segunda autora, financiado pela Capes, CNPq, Fapemig e Embrapa.

<sup>2</sup>Graduando de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Bolsista do CNPq. e-mail: tamarinhalopes@hotmail.com

<sup>3</sup>Doutorando do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – UFJF/Juiz de Fora – Bolsista da Capes. e-mail: juresende2003@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Graduando de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora. Bolsista de Apoio Técnico em Extensão, Embrapa Gado de Leite. e-mail: samuel90@gmail.com

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite. e-mail: jailton.carneiro@embrapa.br, junior.lima@embrapa.br, marlice.ribeiro@embrapa.br, marcelo.otenio@cnpqgl.embrapa.br

<sup>5</sup>Departamento de Imunologia, Parasitologia e Microbiologia – UFJF – e-mail: vania.lucia@ufjf.com.br; claudio.diniz@ufjf.com.br

**Resumo:** O uso de biodigestores é uma das alternativas para o tratamento de dejetos com geração de biogás e biofertilizante, contribuindo para sustentabilidade da cadeia produtiva do leite. O manejo inadequado desses dejetos, ricos em matéria orgânica e agentes patogênicos, acaba por levar ao meio aquático e solo microrganismos potencialmente causadores de doenças. O sistema de tratamento foi composto por dois biodigestores de aproximadamente 57 litros, instalados no laboratório de Resíduos da Embrapa Gado de Leite. Amostras do afluente (carregamento inicial) e do efluente (biofertilizante) foram processadas por diluição seriada ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). Aliquotas (100  $\mu$ l) foram retiradas e transferidas para meios de cultura seletivos e incubadas em aerobiose e anaerobiose. Após crescimento, foram realizadas a contagem e a observação das características morfológicas dos grupos microbianos predominantes. A biodigestão dos dejetos reduziu a contagem de *Staphylococcus* sp. e de BGN F (bastonetes Gram negativos-fermentadores). Foi também observado, aumento do número de BGN NF (bastonetes Gram negativos não-fermentadores) e do número de bactérias anaeróbicas ou anaeróbicas facultativas. Esta mudança populacional ocorreu, provavelmente, em função das mudanças físico-química e microbiológica verificadas no sistema e pela produção de metano e gás carbônico em anaerobiose.

**Palavras-chave:** biodigestão anaeróbia, biofertilizante, biogás, quantificação microbiológica.

**Abstract:** The use of digesters is an alternative for the treatment of waste to generate biogas and biofertilizer, contributing to sustainability of milk productive chain. The inadequate management of waste, rich in organic matter and pathogens, eventually leads to the aquatic and soil environment microorganisms potentially disease-causing. The treatment system was composed of two digesters of about 57 liters, installed in laboratory wastes from Embrapa Dairy Cattle. Samples of the effluent (initial loading) and effluent (biofertilizer) were processed by serial dilution ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ ). Aliquot (100  $\mu$ l) were taken out and transferred to selective culture media and incubated aerobically and anaerobically. After growth, the count was performed and the observation of colonial morphology typical of the predominant microbial group. The digestion of waste

decreased *Staphylococcus* sp. and GNR (Gram negative rods) fermenters, was also observed increasing the number of NF GNR (Gram negative non-fermenters rods) and the number of anaerobic or facultative anaerobic bacteria. This population change is probably due to the change in its physico-chemical and microbiological system and the production of methane and carbon dioxide under anaerobic conditions.

**Keywords:** anaerobic digestion, biofertilizer, biogas, microbial quantification.

## Introdução

O Brasil destaca-se mundialmente por ser um dos maiores produtores de leite, porém o aumento da produção leva também à maior geração de resíduos e isto vem se tornando um sério problema ambiental. O uso de biodigestores apresenta-se assim, como uma alternativa para o gerenciamento dos dejetos da pecuária com a produção de biogás e biofertilizantes, contribuindo para sustentabilidade da cadeia produtiva. Todavia, quando manuseados ou tratados de forma inadequada, esses dejetos, ricos em matéria orgânica e agentes patogênicos, podem ser responsáveis tanto pela poluição de águas superficiais e subterrâneas, devido ao carreamento desse material pela ação das chuvas, quanto do solo. Deve-se controlar o processo de tratamento para garantir a inativação de microrganismos potencialmente patogênicos, porque estes são capazes de disseminar doenças no rebanho, para outras espécies e para o homem, ainda a deposição no solo como biofertilizante, quando mal manejada pode favorecer a proliferação de moscas (GUNASEELAN, 1997; ADHIKARI et al., 2005). Além disso, tem-se estudado o uso desta biomassa como insumo energético (AMARAL et al., 2004).

Considerando-se a importância ambiental e econômica do tratamento dos dejetos da pecuária leiteira, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a dinâmica populacional microbiana de biodigestor em escala piloto (bancada) operado em contínuo, avaliando os aspectos microbiológicos do afluente e efluente pela contagem em placa com meios seletivos para cultivo de microrganismos.

## Material e Métodos

Foram realizados ensaios de biodigestão anaeróbia em dois biodigestores de escala piloto (bancada) com volume útil médio de 57 L, instalados no Laboratório de Gestão de Resíduos, operados com tempo de retenção hídrico (TRH) de 45 dias. Os dejetos utilizados no carregamento inicial dos biodigestores, assim como para nos abastecimentos diários, ocorridos após 15<sup>a</sup> dia, foram coletados no Campo Experimental José Henrique Brusqui, em Coronel Pacheco - MG. Para substrato dos biodigestores foi preparado uma diluição de fezes bovinas frescas + água de lavagem dos pisos (água de reuso) do *free stall*, com teor de sólidos totais em torno de 2 - 3%. Foram coletadas uma amostra do afluente (carregamento inicial), no 1<sup>a</sup> dia, e duas amostras do efluente (biofertilizante), para cada biodigestor no 15<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> dias. Essas amostras foram coletadas em frascos descartáveis estéreis e transportadas, imediatamente, até o Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite, onde foram procedidas as diluições seriadas em tubos. A partir de 1 mL do afluente ou efluente em 9 mL de solução salina 0,9%, fez-se a primeira diluição ( $10^{-1}$ ) e em seguida as demais,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$ . Os tubos foram homogeneizados e, a partir das diluições obtidas, alíquotas de 0,1 mL foram semeadas com auxílio de alça de Drigalski, em duplicata, nos seguintes meios de cultura seletivos para aeróbios, ágar eosina azul de metileno, ágar hipertônico manitol e ágar bile esculina (suplementado com 0,01% de azida sódica) e para anaeróbios, ágar *Bacteroides* bile esculina e ágar Omata. Posteriormente, os meios para aeróbios foram incubados estufa bacteriológica e os anaeróbios, em câmara de anaerobiose, ambos a 37 °C, por 24 horas.

Após o período de incubação e a partir dos crescimentos obtidos, foram realizadas a contagem e a observação das características morfológicas coloniais típicas dos grupos microbianos predominantes encontrados no afluente e no efluente.

## Resultados e Discussão

A análise microbiológica quantitativa (Tabela 1) das amostras (afluente e efluente) incubadas em aerobiose indica diminuição do número de CGP (cocos Gram-positivos) no ágar hipertônico manitol, meio de cultivo seletivo para isolamento de *Staphylococcus* sp. No meio seletivo para *Enterococcus* sp., foi observado aumento do número deste CGP. A partir das amostras coletadas também foi possível observar o aumento do número de BGN não fermentadoras nos efluentes, assim como a diminuição do número de BGN fermentadores, ambos isolados em meio seletivo para bactérias entéricas (ágar eosina azul de metileno).

Com relação à quantificação nos meios anaeróbios, ágar *Bacteroides* bile esculina, houve diminuição do número de bactérias anaeróbias facultativas e/ou estritas quando comparados à carga (tempo inicial) e afluentes, após 15<sup>a</sup> e 30<sup>a</sup> dias. Enquanto que para o ágar Omata e Disraely, houve uma estabilização do número de contagem dessas bactérias.

Os resultados obtidos (Tabela 1) mostraram uma mudança populacional das bactérias do afluente (carga inicial) para o efluente (biofertilizante). Esta diferença possivelmente decorre pela conversão da matéria orgânica, pela ação de microrganismos anaeróbios, a metano e dióxido de carbono na ausência de oxigênio. Desta forma, a alteração nos grupos bacterianos anaeróbios facultativos e/ou estritos ocorre pelo aumento de microrganismos metanogênicos, que são não cultiváveis, não só por limitações metodológicas, mas também por falta de conhecimento das respectivas necessidades metabólicas e nutricionais (KIRK et al., 2004).

As bactérias atuam simbiótica e sinergeticamente, utilizando a matéria orgânica de forma assimilativa para o crescimento da população de microrganismos do processo. Durante a digestão anaeróbia inúmeras variáveis como: temperatura de operação do biorreator, tempo de residência do substrato no biorreator, composição do substrato, pH do meio, tamanho das partículas, entre outros, podem influenciar a dinâmica populacional (LYAUTEY et al., 2003; SCHNÜRER e JARVIS, 2005).

**Tabela 1.** Avaliação das quantificações realizadas por diluições seriadas, em meios aeróbicos e anaeróbicos nas amostras coletadas do afluente (carga inicial) e efluentes (biofertilizantes 1 e 2) .

Tempo (dias)	Meios de cultivo	0 (UFCs/mL)	15 dias (UFCs/mL)		30 dias (UFCs/mL)	
		Carga	Bio 1	Bio 2	Bio 1	Bio 2
EMB:						
Fermentadores		1,1x10 <sup>6</sup>	5x10 <sup>5</sup>	4,8x10 <sup>4</sup>	2x10 <sup>5</sup>	2x10 <sup>5</sup>
Não-fermentadores		7x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>6</sup>	3,06x10 <sup>5</sup>	3,1x10 <sup>6</sup>	1,6x10 <sup>6</sup>
Manitol		3 x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>	2,9x10 <sup>3</sup>	8,9x10 <sup>2</sup>	1,9x10 <sup>2</sup>
BE		4,3x10 <sup>4</sup>	2,3x10 <sup>3</sup>	1x10 <sup>3</sup>	1,2x10 <sup>5</sup>	9,7x10 <sup>4</sup>
BBE		1,4x10 <sup>6</sup>	1x10 <sup>5</sup>	4,4x10 <sup>4</sup>	1,6x10 <sup>4</sup>	5x10 <sup>3</sup>
Omata e Disraely		4,3x10 <sup>6</sup>	2,9x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>4</sup>	2,8x10 <sup>6</sup>	3,3x10 <sup>6</sup>

EMB = ágar eosina azul de metileno; Manitol = ágar hipertônico manitol; BE = ágar bile esculina; BBE = ágar *Bacteroides* bile esculina; Omata = ágar Omata e Disraely; Bio 1 = Biofertilizante 1 (efluente); Bio 2 = Biofertilizante 2 (efluente); carga = carga inicial de abastecimento (afluente).

## Conclusões

A análise do resultado da contagem dos microrganismos, dos diferentes grupos bacterianos avaliados em meios seletivos cultivados em aerobiose e anaerobiose mostrou-se eficiente para o acompanhamento da dinâmica populacional da biodigestão anaeróbica. O crescente interesse na adoção de biodigestores para otimização e sustentabilidade energética da produção pecuária tem como uma de suas vantagens a eliminação das

bactérias patogênicas dos resíduos, o que permite a redução do potencial poluidor e dos riscos sanitários na utilização do biofertilizante.

### **Agradecimentos**

Ao Laboratório de Fisiologia e Genética Molecular Bacteriana, do Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia do ICB/UFJF pela parceria. A Fapemig, CNPq, Capes e Embrapa pelo apoio financeiro.

### **Literatura Citada**

AMARAL, C. M. C.; AMARAL, L. A.; LUCAS JUNIOR, J. Biodigestão anaeróbia de dejetos de bovinos leiteiros submetidos a diferentes tempos de retenção hidráulica. **Ciência Rural**, v. 34, n. 6, p. 1897-1902, 2004.

ADHIKARI, M.; PAUDEL, K. P.; MARTIN JUNIOR, N. R.; GAUTHIER, W. M. Economics of dairy waste use as fertilizer in central Texas. **Waste Management**, n. 25, p. 1067-1074, 2005.

GUNASEELAN, V. N. Anaerobic digestion of biomass for methane production: a review. **Biomass and Bioenergy**, v. 13, n. 2, p. 83-114, 1997.

LYAUTEY, E.; TEISSIER, S.; CHARCOSSET, J. Y.; ROLS, J. L.; GARABETIAN, F. Bacterial diversity of epilithic biofilm assemblages of an anthropised river section, assessed by DGGE analysis of a 16S rDNA fragment. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 33, p. 217-224, 2003.

KIRK, J.; BEAUDETTE, L.; HART, M.; MOUTOGLIS, P. Methods of studying soil microbial diversity. **J. Microbiol Methods**, v. 58, p. 169-188, 2004.

SCHNÜRER, A.; JARVIS, A. **Microbiological Handbook for Biogas Plants**: Swedish Waste Management U2009:03. Swedish Gas Centre Report 207. Avfall Sverige, Malmö, 2009.



# **Teores de proteína bruta e fibra em detergente neutro da *Brachiaria decumbens* em monocultivo e em sistema silvipastoril submetida ou não à fertilização<sup>1</sup>**

## **Percentage of crude protein and neutral fiber detergent of *Brachiaria decumbens* in monoculture and in silvopastoral system submitted or not to fertilization**

Bruno da Costa Domith<sup>2</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>3</sup>, Clenardo Macedo Lopes<sup>4</sup>, Daniele Pereira da Silva<sup>5</sup>, Mirton José Frota Morenz<sup>3</sup>, Carlos Augusto de Miranda Gomide<sup>3</sup>, Carlos Renato Tavares de Castro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de mestrado do terceiro autor

<sup>2</sup>Graduando em Ciências Biológicas - CESJF/Juiz de Fora. Bolsista da Fapemig. e-mail: bcdomith@hotmail.com

<sup>3</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite

<sup>4</sup>Mestrando do Programa de Zootecnia

<sup>5</sup>Graduada em Ciências Biológicas - CESJF/Juiz de Fora.

**Resumo:** Sistema silvipastoril (SSP) é uma forma de uso da terra que tem sido preconizada para alcance da sustentabilidade dos sistemas de produção animal. Entretanto, o sombreamento imposto pelas árvores pode afetar o valor nutritivo do pasto. O trabalho foi desenvolvido na Embrapa Gado de Leite com o objetivo de avaliar o teor de proteína bruta e fibra em detergente neutro da *Brachiaria decumbens*, cv. Basilisk, cultivada na presença ou não de calagem com calcário e a fertilização com P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O e N, em três ambientes em termos de radiação: sol pleno (0% de sombra), sombreamento moderado (30% sombra) e sombreamento intenso (70% de sombra), os dois últimos foram obtidos dentro de um sistema silvipastoril composto por *Acacia mangium*, *A. angustissima* e *Mimosa artemisiana* e *Eucalyptus grandis*. Foi usado o delineamento de blocos casualizados, num esquema fatorial (3x2), com quatro repetições. O teor de proteína bruta da *B. decumbens* aumentou em relação com o sombreamento e não sofreu efeito da fertilização. O teor de FDN não apresentou efeito da fertilização e respondeu, com grau de pequena magnitude e sem padrão definido, ao sombreamento.

**Palavras-chave:** *Brachiaria decumbens*. Sistema silvipastoril. Sombreamento. Valor nutritivo.

**Abstract:** Silvopastoral system (SSP) is a way of soil use that has been recommended to achieve sustainability in animal production systems. The study was developed at "Embrapa Gado de Leite" to evaluate the percentages of crude protein and neutral fiber detergent of *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk, grown in the presence or absence of liming and fertilization with P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, K<sub>2</sub>O and N, in three environments in terms of radiance: full sun (0% shade), moderate shade (30% shade) and intensive shading (70% shade), the latter two were obtained in a silvopastoral system composed by *Acacia mangium*, *A. angustissima* e *Mimosa artemisiana* and *Eucalyptus grandis*. Was used a completely randomized design in a factorial arrangement (3x2x4) with four replications. The percentage of crude protein on *B. decumbens* increased on relation of shading and did not response to fertilization. The percentage of NFD did not presented effect of the fertilization and responded with a small degree and without defined pattern from shading.

**Keywords:** *Brachiaria decumbens*. Nutritive value. Shading. Silvopastoral system.

## Introdução

As áreas de pasto no Brasil são de inquestionável importância para a produção de bovinos, dentre vários fatores, o baixo custo da produção à pasto é a principal razão de sua grande utilização.

Da área hoje usada para pastagem no Brasil, o que se compreende algo em torno de 180 milhões de hectares (IBGE, 2006), estima-se que cerca de 80 a 90% dos pastos são compostos por forrageiras do gênero *Brachiaria*. Segundo Macedo & Kichel, Zimmer (2000) cerca de 80% dos pastos da região central do Brasil apresentam algum grau de degradação do solo e, esta perda é acelerada devido a alguns fatores como o manejo inadequado da área, a falta de adubação de manutenção dentre outras.

Os sistemas silvipastoris têm sido preconizados para a recuperação de pastos degradados. A implementação de árvores em área de pasto, além de melhorar a conservação do solo e dos recursos hídricos, aumenta o sequestro de carbono e a ciclagem de nutrientes (PAGIOLA et al., 2004) e melhora a qualidade da forragem (PACIULLO et al., 2007). Contudo, o sombreamento pode interferir na eficiência de resposta à fertilização do pasto, o que pode influenciar a produção e a qualidade da forragem. Este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos do sombreamento e da adição de calcário e fertilizantes sobre a qualidade nutricional da *Brachiaria decumbens*.

## Material e Métodos

O trabalho foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco - MG, durante o período de novembro de 2010 a abril de 2011. As coordenadas geográficas do local são 21°33'22" de latitude Sul, 43°06'15" de longitude Oeste, e 410 m de altitude. O clima da região, de acordo com a classificação de Köppen, é do tipo Cwa (mesotérmico). O solo da área experimental é do tipo Latossolo Vermelho-Amarelo, distrófico de textura argilosa e relevo ondulado.

As parcelas foram estabelecidas em um sistema silvipastoril instalado em novembro de 1997, em uma pastagem de *Brachiaria decumbens* cv. Basilisk em uma área montanhosa, com declividade de aproximadamente 30%. O componente arbóreo foi constituído pelas leguminosas *Acacia mangium*, *A. angustissima*, *Mimosa artemisiana* e *Eucalyptus grandis*.

Para o estabelecimento das árvores adotou-se o plantio em renques, cada um com quatro linhas, no espaçamento de 3 x 3 m. As faixas com árvores foram estabelecidas em nível e foram distanciadas de 30 m umas das outras, totalizando uma densidade de 342 árvores por hectare.

As características do solo em outubro de 2010 eram: pH em água, 4,26; P disponível (Mehlich-1), 2,98 mg dm<sup>-3</sup>; AL, 0,94 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>; K, 38,2 mg dm<sup>-3</sup>; Ca, 0,44 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup> e Mg, 0,24 cmol<sub>c</sub> dm<sup>-3</sup>.

Os tratamentos foram dispostos em delineamento de blocos casualizados, em esquema fatorial 3 x 2, com quatro repetições. Os tratamentos foram constituídos de três ambientes em termos de radiação incidente: sol pleno, sombreamento moderado e sombreamento intenso, na presença ou ausência de calagem/fertilização do solo, durante quatro ciclos de crescimento.

As parcelas sob sol pleno foram alocadas em uma pastagem de *B. decumbens* estabelecida em área contígua ao sistema silvipastoril. O sombreamento moderado foi de 32% da radiação fotossinteticamente ativa (RFA) plena e foi obtido na faixa entre 8 e 12 m do renque de árvores. O sombreamento intenso foi de 70% da RFA plena e foi obtido dentro da faixa arborizada. As medições da RFA foram realizadas bimensalmente, com auxílio de um ceptômetro da marca Decagon, modelo LP 80, em dias com céu límpido, e às 9:00, 12:00 e 15:00h, a fim de captar a variação diária de luminosidade. Em cada parcela, foram feitas cinco leituras de RFA incidente, ao longo de uma linha paralela ao renque de árvores. As parcelas apresentavam área igual a 20 m<sup>2</sup> (5 X 4m).

Foi aplicada a dose de calcário necessária para elevação da saturação por bases do solo para 40%. O calcário foi aplicado em superfície, trinta dias antes do corte de uniformização. Os nutrientes foram aplicados após o corte de uniformização no início do trabalho, na dose de 40 kg/ha para K<sub>2</sub>O e N e 60 Kg/ha para P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. Após o segundo ciclo de crescimento foi aplicado mais uma dose de 40 Kg/ha de K<sub>2</sub>O e N. Foram usados como fontes de fósforo o superfosfato simples, de potássio o cloreto de potássio e de nitrogênio, a uréia. As avaliações foram realizadas durante quatro ciclos de crescimento, os quais perfazendo os períodos de 28, 28, 35 e 40 dias, para os ciclos de 1 a 4, respectivamente.

Duas amostras de forragem foram coletadas em cada parcela, à altura de 15 cm acima do nível do solo, sempre que o dossel atingia a altura média de 40 cm. A adoção dessa altura levou em conta o estrato considerado para o pastejo dos animais. Foi usada moldura metálica de 0,5 x 0,5 m. As amostras foram pesadas e secas em estufas de circulação forçada de ar a 55 °C, durante o período de 72 horas. Após secas as amostras foram moídas em um moinho com peneira de 1 mm.

As amostras foram submetidas às determinações dos teores de proteína bruta, fibra em detergente neutro (SILVA E QUEIROZ, 2002).

Os dados obtidos foram submetidos às análises de variância, realizadas com dados não transformados, por meio do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS® (*Statistical Analysis System*), versão 9.0 para Windows, específico para casos de medidas repetidas no tempo (ciclos de crescimento) e em que o tempo é um fator a ser estudado como causa de variação. A escolha de matriz de variância e de covariância foi feita utilizando-se o Critério de Informação de Akaike e a análise de variância feita com base nas seguintes causas de variação: percentagem de sombreamento, dose de adubação e ciclos de crescimento e as interações entre elas. Os efeitos de percentagem de sombreamento, dose de adubação, ciclos de crescimento e suas interações foram considerados fixos e, como efeitos aleatórios, foram considerados o erro experimental entre unidades e o erro para a mesma unidade no tempo. As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste LSMENS ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

O teor de PB variou ( $P < 0,05$ ) com as interações ciclo de crescimento x sombreamento (Tabela 1) e fertilização x ciclo de crescimento (Tabela 2).

Para as condições de sol pleno e nível intermediário de sombreamento, observaram-se maiores teores no terceiro ciclo, provavelmente em razão desse período de crescimento ter sido subsequente a um veranico. Com a retomada do crescimento das plantas existentes no pasto, após o período seco prolongado (38 dias), surgiram novos perfilhos, com as primeiras chuvas após o veranico. Na sombra intensa, provavelmente as melhores condições de umidade do solo, em decorrência da menor evapotranspiração (WILSON, 1996), mesmo com período prolongado de seca, podem ter contribuído para a estabilização dos teores de PB nos três primeiros ciclos.

Quanto ao efeito do sombreamento, observa-se que os teores de PB foram proporcionais à intensidade de sombreamento imposta pelo componente arbóreo. Esse aumento no teor de proteína sob sombreamento, em relação às condições de sol pleno, é amplamente descrito na literatura (BARRO et al., 2008). O sombreamento natural proporciona aumento na degradação da matéria orgânica do solo e a maior reciclagem de matéria orgânica (WILSON, 1996). Assim, o aumento no teor de PB causada pela sombra está relacionado a um aumento na fertilidade do solo, especialmente se leguminosas fixadoras de nitrogênio atmosférico forem parte do componente arbóreo da pastagem.

**Tabela 1.** Teor de Proteína bruta conforme a interação níveis de sombreamento x ciclos de crescimento.

Sombreamento	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Sol	8,46 Cc	8,11 Cc	12,61 Ab	9,84 Bb
Sombra moderada	9,90 Cb	9,92 Cb	12,15 Ab	10,97 Bb
Sombra intensa	14,10 Ba	14,66 Ba	14,33 Ba	16,26 Aa

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, são iguais pelo teste LSMENS ( $P < 0,05$ ).

Com o avançar dos ciclos de crescimento o teor de PB aumentou nas parcelas que receberam adubação; já nas parcelas sem adubação o aumento se deu até o terceiro ciclo, decrescendo deste para o último ciclo (Tabela 2).

Comparando os resultados das parcelas com e sem adubação, pode-se observar que houve diferença significativa no teor de PB apenas no ultimo ciclo, com aumento de 13% no teor em resposta à fertilização, provavelmente em razão da ocorrência de chuvas durante este ciclo, após o veranico.

**Tabela 2.** Teor de proteína bruta pela interação ciclos de crescimento X adição de adubos

Adubação	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Com	10,98 Ba	10,96 Ba	12,82 Aa	13,11 Aa
Sem	10,66 Ca	10,84 BCa	13,23 Aa	11,60 Bb

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, são iguais pelo teste LSMENS ( $P < 0,05$ ).

O teor de FDN variou ( $P < 0,05$ ) com a interação sombreamento x ciclo de crescimento (Tabela 3). O teor de FDN foi menor sob sombra intensa no primeiro, segundo e terceiro ciclos. Esse resultado é semelhante ao observado por Deinum et al. (1996) com *Brachiaria brizantha* e *Panicum maximum* sob sombreamento artificial. Esse mesmo autor afirma que os maiores teores de FDN a sol pleno em relação aos tratamentos sombreados, podem estar ligados ao aumento da proporção de tecido esclerenquimático, cujas células apresentam paredes mais espessa (DEINUM et al., 1996). Quando ao efeito do ciclo, este não mostrou padrão definido de resposta.

**Tabela 3.** Teor de fibra em detergente neutro pela interação níveis de sombreamento X ciclos de crescimento.

Sombreamento	Ciclo 1	Ciclo 2	Ciclo 3	Ciclo 4
Sol	70,99 Aa	65,60 Ba	64,31 Bb	65,15 Ba
Sombra moderada	68,34 Ab	62,10 Db	66,21 Ba	64,26 Ca
Sombra intensa	66,46 Ac	63,05 Bb	66,22 Aa	61,01 Cb

Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, são iguais pelo teste LSMENS ( $P < 0,05$ ).

## Conclusões

O teor protéico do pasto foi proporcional ao nível de sombreamento, sendo maior sob a copa das árvores e menor em condições de sol pleno, mas não apresentou resposta à fertilização.

Os teores de FDN da forrageira não variaram com a fertilização e foram, na maior parte do período experimental, menores sob sombra intensa, embora as diferenças tenham sido de pequena magnitude.

As características nutricionais foram influenciadas pelos ciclos de crescimento, mas as respostas foram variáveis à medida que os ciclos se sucederam.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura Citada

BARRO, R. S.; SAIBRO, J. C.; MEDEIROS, R. B.; SILVA, J. L. S.; VARELLA, A. C. Rendimento de forragem e valor nutritivo de gramíneas anuais de estação fria submetida a sombreamento por *Pinus elliotti* e ao sol pleno. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.10, p.1721-1727, 2008

DEINUM, B.; SULASTRI, R. D.; ZEINAB, M. H. J.; MAASSEN, A. Effects of light intensity on growth, anatomy and forage quality of two tropical grasses (*Brachiaria brizantha* and *Panicum maximum* var. Trichoglume). **Netherlands Journal of Agricultural Science**, v.44, p.111-124, 1996.

IBGE - LEVANTAMENTO SISTEMÁTICO DA PRODUÇÃO AGRÍCOLA. Rio de Janeiro, agosto de 2006. Disponível em: <www.ibge.gov.br>

MACEDO, M. C. M.; KICHEL, A. N.; ZIMMER, A. H. **Degradação e alternativas de recuperação e renovação de pastagens**. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 2000. 4 p. (Comunicado Técnico, 62).

PAGIOLA, S.; AGOSTINI, P.; GOBBI, J.; HAAN, C.; IBRAHIM, M.; MURGUEITIO, E.; RAMÍREZ, E.; ROSALES, M.; RUÍZ, J. P. **Paying for biodiversity conservation services in agricultural landscapes**. In: Environment Department Paper, 96. Washington: World Bank, 2004. 26 p.

WILSON, J. R. Shade-stimulated growth and nitrogen uptake by pasture grasses in a subtropical environment. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 47, p. 1075-1093, 1996.

**Produção de leite em pastagem de capim-Marandu submetido ao período de descanso fixo ou conforme a interceptação luminosa pelo dossel forrageiro**

**Milk production on Marandugrass pasture submitted to fixed rest period or accord to the light interception by the canopy**

Emiliano Araújo Salgado<sup>1</sup>, Carlos Augusto de Miranda Gomide <sup>2</sup>, Albert José do Anjos<sup>3</sup>, Vinícius Sacramento Pacheco<sup>1</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>2</sup>, Mirton José da Frota Morenz<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsistas/Estagiários da Embrapa Gado de Leite – email: emiliano.sal15@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite – e-mail: carlos.gomide@embrapa.br

<sup>3</sup>Mestrando da UFVJM – email: albert@zootecnista.com.br

**Resumo:** O estudo foi desenvolvido em piquetes de capim-Marandu, com 16 vacas mestiças como animais de prova avaliando dois intervalos de descanso, um com período fixo de 30 dias (PD fixo) e outro baseado na interceptação luminosa de 95% do dossel forrageiro (IL 95). Foram realizados 5 ciclos de pastejo na estação chuvosa. Foi utilizado o delineamento de blocos casualizados com duas repetições e medidas repetidas no tempo. Foram avaliadas características de produção de forragem, como: altura do pasto em pré-pastejo, massa de forragem verde (MFV), relação folha/colmo (RFC); e produção de leite por animal e por área. O período de descanso diferiu entre os tratamentos com valores de 25,2 e 30 dias, respectivamente para IL95 e PD fixo. Os ciclos de pastejo afetaram a MFV, a RFC e por consequência a produção de leite. A altura do pasto foi de 51 cm para o IL95 e 55,1 cm para o PD fixo. A MFV foi semelhante entre os tratamentos, provavelmente em decorrência do veranico ocorrido entre os meses de janeiro a março. Tal fato concorreu ainda para prolongar o período de descanso no manejo baseado na IL 95. A RFC foi maior para o IL95 (1,39 X 1,17). A produção de leite por vaca foi maior para o PD fixo em relação ao IL95. Porém, a produção de leite por área foi maior para o IL95 (73,6 X 63,4 L/ha.dia). Essa maior produção se deve à menor necessidade de piquetes para rodízio dos animais. O menor PD reduz a altura média do pasto à entrada dos animais, melhora a RFC, sem comprometer a MFV disponível, além de aumentar a produtividade.

**Palavras-chave:** altura do pasto, *Brachiaria brizantha*, ciclo de pastejo, período de descanso, produtividade, relação folha/colmo

**Abstract:** The study was carried out in Marandugrass pasture, using 16 crossbred cows as test animals evaluating two rest periods, a fixed period of 30 days (RP30) and another based on light interception of 95% by the canopy (LI 95). There were considered five grazing cycles in the rainy season. The experimental design was a randomized block with two replications and repeated measures in time. There was evaluated the forage production traits as: pasture height, green forage mass (GFM), leaf-stem ratio (LSR); and the milk production (per animal and per hectare). The rest period differ between treatments with average values of 25.2 and 30 days, respectively to LI95 and fixed RP30. The grazing cycles affected the GFM, the LSR and consequently the milk production. The pasture height was 51 and 55.1, respectively to LI95 and RP30. The GFM was similar among treatments, probably due to an Indian summer period occurred between January and March. This fact has contributed to prolong the rest period in the management based on LI95. The LSR was higher for LI95 (1.39 X 1.17). The production of milk per cow was higher for the fixed RP in relation to LI95. However, the milk yield per area was larger for LI95 (73.6 X 63.4 L/ha.day). This higher milk production per area is due to lesser paddocks number for animal rotation. The lower RP reduces the average sward height at the entrance of animals, improves the LSR, without compromising the available GFM as well as increase productivity.

**Keywords:** *Brachiaria brizantha*, grazing cycle, leaf-stem ratio, pasture height, productivity, rest period.

## Introdução

As plantas do gênero *Brachiaria* são caracterizadas pela sua grande flexibilidade de uso e manejo, sendo tolerantes a uma série de limitações e/ou condições restritivas de utilização para um grande número de espécies forrageiras (DA SILVA, 2004). A pastagem se bem manejada, pode constituir-se na principal fonte de nutrientes para vacas mestiças. Entretanto, para que o potencial dessas pastagens se manifeste, é necessário que as espécies forrageiras sejam adaptadas às condições edafoclimáticas locais (BOTREL et al., 1999). Aumentando o potencial produtivo das pastagens, a produção por animal se eleva, dependendo do potencial genético da raça ou dos cruzamentos utilizados, bem como a produção por unidade de área, pelo acréscimo nas taxas de lotação (GONÇALVES et al., 2003). Existem variações no pasto desde o topo até a base do dossel, tanto em quantidade, qualidade e valor nutritivo. Neste sentido, o controle da estrutura do pasto é fundamental para eficiência de pastejo e colheita da forragem produzida. Sendo assim, os animais escolhem as folhas dos capins sem andar áreas extensas e estarão ingerindo folhas verdes, tornando o rebaixamento do pasto uniforme (TRINDADE et al., 2007). As plantas cultivadas em ambientes favoráveis ao seu desenvolvimento crescem mais rapidamente e estarão prontas para serem colhidas mais cedo do que plantas que se desenvolvem em ambientes adversos. Isto altera a produção de forragem por área, fazendo com que em períodos fixos de descanso haja colheita de grande quantidade de forragem “passada” quando as condições são favoráveis ao crescimento. Esse tipo de manejo causa prejuízos à estrutura do dossel forrageiro como acúmulo excessivo de haste e material morto na base do pasto com conseqüente aumento da altura e massa de forragem do resíduo (DA SILVA, 2004). O objetivo do trabalho foi avaliar as características do pasto e a produção de leite por vaca e por área em pasto de capim-Marandu sob lotação rotacionada com período de descanso fixo de 30 dias ou baseado na interceptação luminosa de 95%.

## Material e Métodos

O ensaio foi desenvolvido no Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco – MG, localizado a 21°33' de latitude Sul e 43°6' de longitude Oeste, à 410 metros de altitude, possuindo clima Cwa (mesotérmico) segundo Köppen. Foi feita adubação de cobertura num total de 150 Kg ha<sup>-1</sup> de N, 37,5 Kg ha<sup>-1</sup> de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 150 Kg ha<sup>-1</sup> de K<sub>2</sub>O, fracionado em três doses iguais. Foram utilizadas 16 vacas mestiças (Holandês X Zebu) lactantes como animais de prova, com peso médio de 460 Kg (oito por tratamento) e novilhas com peso médio de 300 Kg, como reguladoras, para ajuste da taxa de lotação e manutenção da altura de resíduo de 25 cm. Foram estudados dois períodos de descanso dos piquetes, sendo um correspondente a 30 dias (fixo) e outro ao tempo necessário para o alcance de 95% de interceptação luminosa (IL) pelo dossel forrageiro. Em ambos o período de ocupação foi de três dias. Foi utilizado o delineamento de blocos completos casualizados com duas repetições. Cada repetição foi subdividida em 11 piquetes de 820 m<sup>2</sup>. Foram avaliados cinco ciclos de pastejo para as características do pasto e quatro ciclos para avaliação da produção de leite dentro da estação chuvosa, no período de 16/11/10 à 27/04/11 (162 dias), considerados como medidas repetidas no tempo. A IL foi avaliada utilizando o aparelho AccuPAR Linear PAR/LAI ceptometer, Model PAR-80. A altura dos pastos foi estimada por meio de leituras em 30-40 pontos tomados aleatoriamente em cada piquete à entrada e saída dos animais. A massa de forragem verde (MFV) foi estimada pelo corte, ao nível do solo, da forragem contida em duas unidades de amostragem de 0,5 m<sup>2</sup> (0,5 x 1 m) por piquete. Essas amostras foram fracionadas em lâminas foliares, colmo (colmo + bainha) e material morto e secas em estufa de circulação forçada a 55 °C por 72 horas. De posse dos dados se estimou a massa de forragem por hectare e a relação folha/colmo (RFC), obtida pela divisão dos

valores das massas secas de lâminas foliares pelos valores das massas secas de colmos. A produção de leite foi estimada a cada 10 dias em duas ordenhas diárias, quando as vacas recebiam 2 Kg de concentrado, 1 Kg em cada ordenha. Os dados foram submetidos a análise de variância e as médias de tratamento comparadas pelo teste de Tukey a 10% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

O período de descanso (PD) variou entre os tratamentos com valores de 25,2 e 30 dias respectivamente para os tratamentos de 95% de IL e PD fixo. Houve também um aumento progressivo do PD médio com os ciclos de pastejo; sendo os valores observados de 25, 25, 27, 30 e 30 dias, respectivamente aos ciclos de pastejo 1, 2, 3, 4 e 5.

Houve efeito da interação ciclo x tratamento para a altura do pasto em pré-pastejo. A altura do pasto não variou com os ciclos de pastejo em nenhum dos tratamentos considerados. Diferenças entre os tratamentos só foram observadas no ciclo 4 em que maior valor foi verificado para o tratamento com PD de 30 dias (56,4 X 41,4 cm) (Tabela 1). Provavelmente, esta diferença se deve ao efeito do veranico observado nos meses de janeiro a março que parece ter afetado mais o pasto manejado intensivamente (95%IL). De fato, Da Silva (2004) alerta que para o sucesso do manejo intensivo do pasto é necessário o atendimento de suas exigências para o rápido restabelecimento após a desfolha.

**Tabela 1.** Altura do pasto em pré-pastejo em resposta aos tratamentos e ciclos de pastejo.

PD	Ciclo					Média
	1	2	3	4	5	
30 dias	58,2 Aa	57,4 Aa	55,8 Aa	56,4 Aa	57,4 Aa	55,1 A
95% IL	48,4 Aa	52,0 Aa	46,0 Aa	41,4 Ba	57,1 Aa	51,0 B
Média	53,3 a	54,7 a	50,9 a	48,9 a	57,2 a	

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 10%.

A massa de forragem verde (MFV) também revelou interação entre ciclo X tratamento (Tabela 2). No tratamento fixo os ciclos de pastejo 2 e 3 apresentaram maiores MFV em relação aos ciclos 1 e 4, enquanto o ciclo 5 não diferiu dos demais. Já no tratamento de 95% de IL foi observada superioridade apenas do ciclo 3 em relação aos ciclos 1 e 2. De fato, era de se esperar uma redução da MFV com o suceder dos ciclos de pastejo em resposta aos fatores climáticos, o que de certa forma ocorreu no tratamento fixo. Para o tratamento de 95% de IL é preciso considerar a variação no PD conforme citado anteriormente. Diferença entre os tratamentos foram observadas somente no ciclo 2, quando maior MFV foi encontrada no tratamento fixo, e ciclo 4, em que maior MFV foi observada para o tratamento de 95% de IL. Maiores valores de massa de forragem têm sido observados sob períodos de descanso fixo relativamente ao de 95% de IL (JORDÃO et al. 2010; VOLTOLINI et al., 2010). No presente trabalho, a ocorrência de forte veranico afetou o PD do tratamento de 95% de IL, o que possivelmente contribuiu para a semelhança dos valores de MFV.

**Tabela 2.** Massa de forragem verde (kg/ha) em resposta aos períodos de descanso (PD) e ciclos de pastejo.

PD	Ciclos					Média
	1	2	3	4	5	
30 dias	4.095 Ab	6.188 Aa	6.002 Aa	4.065 Bb	5.032 Aab	5.077 A
95% IL	4.385 Ab	4.561 Bb	6.163 Aa	5.689 Aab	4.642 Aab	5.088 A
Média	4.240 c	5.375 ab	6.082 a	4.877 bc	4.837 bc	

Médias seguidas de mesma letra, maiúsculas na coluna e minúsculas na linha, não diferem entre si pelo teste Tukey a 10%.



A relação folha/colmo (RFC) foi maior para o período de descanso baseado em 95% IL (1,39 X 1,17), mostrando o benefício do manejo intensivo à estrutura do pasto. Em relação aos ciclos, o primeiro foi o que apresentou maior RFC. O ciclo 5 não se diferenciou do ciclo 2 e este teve valores próximos aos ciclos 3 e 4. Estes dois ciclos tiveram os menores valores provavelmente em decorrência do veranico mencionado acima (Tabela 3). O efeito dos ciclos de pastejo sobre as características produtivas e estruturais do pasto é marcante e relatado na literatura (TRINDADE et al., 2007; JORDÃO et al, 2010).

**Tabela 3.** Relação folha/colmo em resposta aos tratamentos e ciclos de pastejo.

Período de Descanso		Ciclo				
30 dias	95% IL	1	2	3	4	5
1,17 b	1,39 a	1,90 a	1,24 bc	0,89 c	0,98 c	1,38 b

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 10%.

A produção média de leite por vaca foi de 15,3 e 14,6 Kg para o PD fixo e baseado em 95% de IL, respectivamente. A produção foi diminuindo com o decorrer dos ciclos, onde nos dois primeiros ciclos foram registradas as maiores médias (Tabela 4). Este efeito pode ser explicado por dois fatores; do avanço na lactação dos animais e do prejuízo à produção de forragem e estrutura do pasto devido a fatores climáticos menos favoráveis. A produção de leite por área foi de 63,4 Kg/ha sob PD fixo de 30 dias e de 73,6 Kg/ha no período flexível de 95% de IL. Essa maior produção por área no PD de 95% de IL se deve ao fato de não terem sido utilizados todos os piquetes nos dois primeiros ciclos e se não houvesse um veranico tão intenso quanto o ocorrido, provavelmente a produção de leite por área seria ainda maior.

**Tabela 4.** Produção de leite por vaca e por área em resposta aos tratamentos e ciclos de pastejo.

Período de Descanso		Ciclo			
30 dias	95% IL	1	2	3	4
----- Produção de Leite por Vaca (kg/dia) -----					
15,3 a	14,6 a	15,8 a	15,7 a	14,6 b	13,8 c
----- Produção de Leite por Hectare (kg) -----					
63,4 b	73,6 a	72,3 a	71,7 a	66,9 b	63,0 c

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste Tukey a 10%.

## Conclusões

A redução no período de descanso promovida pelo manejo baseado na interceptação luminosa reduz a altura média do pasto à entrada dos animais, melhora a relação folha/colmo, sem comprometer a massa de forragem verde disponível.

O manejo do pastejo baseado na interceptação luminosa de 95%, apesar de levar a uma pequena redução na produção diária de leite por vaca, contribui para obtenção de maior produção de leite por área devido à menor necessidade de piquetes para rodízio dos animais na estação chuvosa.

Os ciclos de pastejo mostram grande efeito sobre a estrutura e a produção de forragem do pasto.

## Agradecimentos

À Deus por concluir este desafio. À Fapemig pela concessão da bolsa de IC. À Embrapa pela oportunidade de realização do treinamento. Ao Dr. Carlos Gomide pela oportunidade e ensinamentos, aos meus familiares e aos amigos de estágios pela amizade e companheirismo, e todos aqueles que me ajudaram a realizar o estágio e este trabalho.

## Literatura Citada

BOTREL, M. A.; ALVIM, M. J.; XAVIER, D. F. Avaliação de gramíneas forrageiras na região Sul de Minas Gerais. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 683-689, 1999.

DA SILVA, S. C. Fundamentos para o manejo do pastejo de plantas forrageiras dos gêneros *Brachiaria* e *Panicum*. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, 2., 2004, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, 2004. p. 347-386.

GONÇALVES, C. A.; DUTRA, S.; AZEVEDO, G. P. C.; CAMARÃO, A. P. Sistema de pastejo rotacionado em *Brachiaria brizantha* cv. Marandu na produção de leite sob níveis de suplementação de concentrado no nordeste paraense, Brasil. **Pasturas Tropicais**, v. 25, n. 3, p. 02-12, 2003.

JORDÃO, A. R.; ABREU, J. B. R.; GOMIDE, C. A. M.; DERESZ, F.; PACIULLO, D. S. C.; CARVALHO, C. A. B. Características estruturais do dossel de pastos de capim-marandu manejados com interceptação luminosa intervalo fixo de pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador, BA. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010. cd rom

TRINDADE, J. K.; DA SILVA, S. C.; SOUZA JÚNIOR, S. J.; GIACOMINI, A. A.; ZEFERINO, C. V.; GUARDA, V. D. A.; CARVALHO, P. C. F. Composição morfológica da forragem consumida por bovinos de corte durante o rebaixamento do capim-marandu submetido a estratégias de pastejo rotativo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 42, n. 6, p. 883-890, 2007.

VOLTOLINI, T. V.; SANTOS, F. A. P.; MARTINEZ, J. C.; CLARINDO, R. L.; PENATI, M. A.; IMAIZUMI, H. Características produtivas e qualitativas do capim-elefante pastejado em intervalo fixo ou variável de acordo com a interceptação da radiação fotossinteticamente ativa. **Revista Brasileira Zootecnia**, v. 39, n. 5, p. 1002-1010, 2010.

# **Avaliação da expressão de genes de estresse e apoptose em fibroblastos bovinos expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Azadirachta indica***

Natana Chaves Rabelo<sup>1</sup>, Michele Munk Pereira<sup>2</sup>, Sabine Wohlres-Viana<sup>2</sup>, Savana Giacomini Brito<sup>3</sup>, Carolina Capobianco Romano Quintão<sup>2</sup>, João Henrique Moreira Viana<sup>2</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduada em Ciências Biológicas – Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

<sup>3</sup>Graduada em Biomedicina – Universidade Presidente Antônio Carlos – Juiz de Fora/MG

**Resumo:** O extrato etanólico de *Azadirachta indica* A. JUSS tem demonstrado potencial de inibição do ciclo de algumas células, podendo ser candidato a contribuir para o aumento da eficiência da Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS). O objetivo do trabalho foi avaliar possíveis efeitos prejudiciais do extrato sobre células expostas a ele, por meio da expressão de genes de estresse e apoptose. A abundância relativa dos transcritos de HSP70.1A, HSBP1, HSP27.P1, BAX, BCL-2 e WNT5A em fibroblastos bovinos expostos às concentrações 50, 100 e 200 µg/mL do extrato, foi realizada em comparação a um controle negativo (0 µg/mL) pela técnica de *Real-Time PCR*. A partir da quantificação pelo método do C<sub>t</sub> (*cycle threshold*) comparativo, foi observado que a maioria dos transcritos avaliados apresentou-se subregulado em relação ao grupo controle, onde apenas HSP27.P1 do tratamento 100 µg/mL e HSP70.1A do tratamento 200 µg/mL não apresentaram diferenças significativas (p>0,05) em relação a ele, evidenciando alteração na expressão destes genes após a exposição ao extrato. Conclui-se que esse extrato pode interferir na transcrição de alguns genes, sendo necessários outros testes para que seja possível determinar se ele pode ser utilizado na TNCS, sem danos às células doadoras de núcleo.

**Palavras-chave:** ciclo celular, reprogramação gênica, transferência nuclear, viabilidade celular.

**Abstract:** The ethanol extract of *Azadirachta indica* A. Juss has shown potential cycle inhibition of some cells, may be a candidate for contributing to increase the efficiency of nuclear transfer of somatic cell (SCNT). The objective of this study was to evaluate possible harmful effects of the extract on cell exposed to it, through the expression of genes for stress and apoptosis. The relative abundance of transcripts HSP70.1A, HSBP1, HSP27.P1, BAX, BCL-2 and WNT5A at bovine fibroblasts exposed to concentrations 50, 100 and 200 µg/mL of the extract was performed in comparison to a negative control (0 µg/mL) by technique of Real-Time PCR. From the quantification method of C<sub>t</sub> (cycle threshold) of comparison, it was observed that most of the transcripts evaluated is down regulated in relation to control group, where only HSP27.P1 treatment 100 µg/mL and HSP70.1A treatment 200 µg/mL showed no significant differences (P>0,05) in relation to it, revealing a change in expression of these genes after exposure of cells to extract. In conclusion, this extract can interfere with the transcription of some genes, additional tests are needed to be able to determine if it can be used in SCNT without damage to the donor nucleus cell.

**Keywords:** cell cycle, cell viability, gene reprogramming, nuclear transfer.

## **Introdução**

A técnica de Transferência Nuclear com Células Somáticas (TNCS) é considerada atualmente uma das mais avançadas biotecnologias, principalmente na pecuária. Entretanto, ela ainda apresenta baixa eficiência, onde apenas uma pequena proporção (de

0 a 4%) de embriões reconstruídos se desenvolve normalmente (HEYMAN et al., 2002). Dentre os principais fatores que interferem no desenvolvimento desses embriões, destaca-se a fase do ciclo em que as células doadora e receptora se encontram no momento da TN (WILMUT et al., 1998).

Segundo Campbell et al. (1996), durante o final da fase G2 até o início da G1, a cromatina é capaz de se redirecionar e permitir a reprogramação nuclear. No caso da transferência de um núcleo diplóide (2 n), os cromossomos se condensam, se organizam na placa metafásica e são deslocados, aleatoriamente, para os pólos do fuso. Posteriormente, sofrem descondensação para a síntese do DNA e para a primeira divisão mitótica (SOLTER, 2000). Já no caso de um núcleo doador em fase S (4 n), a cromatina sofre condensação prematura quando introduzida no citoplasma de oócitos MII (metáfase II), alterando sua integridade (RAO, 1990), o que compromete a capacidade de responder às demandas enviadas pelo citoplasma para o início do desenvolvimento embrionário.

Dentre os métodos de inibição do ciclo celular mais utilizados atualmente, estão a confluência (inibição por contato celular) e a soroprivação (retirada parcial de soro do meio de cultivo). Existem também alguns químicos utilizados para a mesma finalidade, todos apresentando um efeito reversível. Entretanto, nenhum destes métodos é 100% eficaz pois, além de não proporcionarem a parada do ciclo sincronicamente entre as células em cultivo, podem provocar danos no DNA e levar à apoptose (KUES et al., 2000).

Uma alternativa a esses métodos seria a utilização de extratos vegetais, como é o caso da *Azadirachta indica* A. Juss (nim), que já apresentou eficiência em estacionar o ciclo de células cancerígenas (KUMAR et al., 2006). Por outro lado, além de proporcionar a parada do ciclo, alguns efeitos deletérios foram observados após sua administração, o que poderia se tornar um problema para a utilização na TNCS. Entretanto, a toxicidade parece depender diretamente da dosagem administrada, como observado por Kumar et al. (2006), que relataram *up regulation* de proteínas Bax (pró-apoptóticas) de forma dose-dependente do extrato etanólico de *Azadirachta indica*.

Pelo o exposto acima, extratos deste vegetal são candidatos à inibição do ciclo celular, mas é necessário avaliar seus possíveis efeitos citotóxicos para viabilizar a utilização na TNCS. Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo avaliar a expressão de alguns genes relacionados ao estresse celular e apoptose em fibroblastos bovinos expostos a diferentes concentrações do extrato etanólico de *Azadirachta indica*.

## Material e Métodos

Foram utilizados fibroblastos coletados de uma vaca Gir do Campo Experimental José Henrique Bruschi, Coronel Pacheco-MG, pertencente a Embrapa Gado de Leite, que foram previamente cultivados e congelados em nitrogênio líquido (N<sub>2</sub>). O cultivo dos fibroblastos foi realizado em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM – SIGMA), acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de antibiótico (estreptomicina + penicilina). Foram realizados três tratamentos com diferentes concentrações do extrato etanólico: 50, 100 e 200 µg/mL, durante 24 horas de exposição. O extrato foi adicionado ao meio de cultivo no momento em que as células atingiram 30-40% de confluência da placa. Após a retirada do meio com o extrato, as células foram distribuídas em tubos criogênicos de 1,0 mL, com 2 x 10<sup>6</sup> de células em 20 µL de PBS para cada tratamento, em triplicata e, imediatamente, congeladas em N<sub>2</sub>. As células foram estocadas em *freezer* à -80 °C até o momento da extração do RNA total.

Para a extração do RNA foi utilizado o kit comercial *RNeasy Micro Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha) de acordo com as especificações do fabricante. Do volume final recuperado após o procedimento, aproximadamente 11 µL, foi retirada uma amostra de 1 µL para quantificar o RNA total, através do aparelho espectrofotômetro nd-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, EUA). A transcrição reversa para a síntese do cDNA foi realizada com o Kit comercial *SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

Os *primers* (β-ACTINA, HSP70.1A, HSBP1, HSP27.P1, BAX, BCL-2 e WNT 5a) foram desenhados a partir de sequências disponíveis no banco de dados do GenBank

([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)) utilizando o programa Prime3 (ROZEN; SKALETSKY, 2000) e a sequência do *primer* GAPDH foi obtida a partir da referência de Mourrot et al. (2006). Todos os *primers* foram sintetizados pela *Integrated DNA Technologies* (Coralville, IA, EUA) e estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Informações dos *primers* utilizados.

Produto	Sequência do primer	Temperatura de pareamento	Tamanho do produto (pb)	Nº de acesso no GenBank/Referência
β-ACTINA (endógeno)	F5'GACATCCGCAAGGACCTCTA3' R 5'ACATCTGCTGGAAGGTGGAC3'	53 °C	205	NM_173979
GAPDH (endógeno)	F5'CCAACGTGTCTGTTGTGGATCTG3' R 5'GAGCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG3'	53 °C	237	Mourrot et al., (2006)
HSP70.1A	F5'CGGAGAAGGACGAGTTTGAG3' R 5'ACATGAGCAATCCAGGGAAG3'	59 °C	192	NM203322.2
BAX	F5'TTTGCTTCAGGGTTTCATCCAGGA3' R 5'CAGCTGCGATCATCCTCTGCAG3'	64 °C	174	NM173894
BCL-2	F5'TGGATGACCGAGTACCTGAA3' R 5'CAGCCAGGAGAAATCAACA3'	53 °C	120	XM_586976
HSBP.1	F5'TGCAGGATCTCACCTCAGTG3' R 5' GTTCCAGATTCCAGCGAAGA3'	55 °C	236	NM_001113316.1
WNT5a	F5'GAGAGCGCGCCATCCTGAT3' R 5' CAGCTGCAGCCAGCACGTCT3'	67 °C	135	NM_001205971.1
HSP27.P1	F5'AGCTGACGGTCAAGACCAAG3' R 5' GGGGACAGAGAGGAGGAGAC3'	57 °C	154	NM_001025569.1

A abundância de cDNA de cada amostra foi realizada utilizando a metodologia de PCR em Tempo-Real. Foi utilizado o kit comercial *QuantiTect Sybr Green PCR Kit* (QIAGEN), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram feitas reações em triplicata para cada amostra e controles negativos foram preparados, onde o cDNA foi omitido durante a reação e substituído por H<sub>2</sub>O, em placas ópticas de reação de 96 poços (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, USA). As placas foram seladas com filme adesivo óptico (*Applied Biosystems*) e amplificadas no aparelho ABI PRISM® 7300 *Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems*), sob incubação por 95 °C por 15 min., seguido de 45 ciclos de 94 °C por 15 seg., ligação na temperatura específica para cada *primer* (conforme descrito na Tabela 1) por 30 seg e extensão a 72 °C por 30 seg.

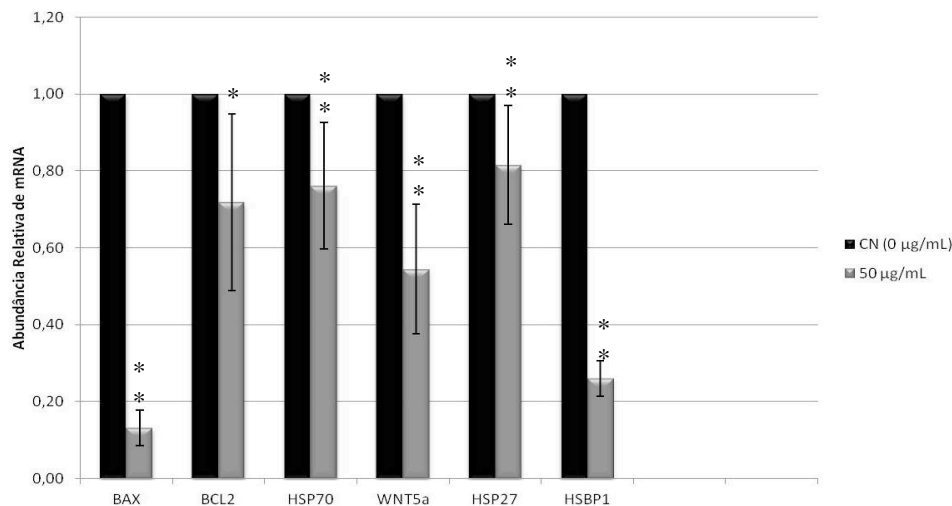
A quantificação foi realizada utilizando-se o método do C<sub>t</sub> (*cycle threshold*) comparativo, com os resultados expressos relativos a genes de referência endógena e um grupo controle. Como a quantificação relativa se baseia na frequência relativa dos transcritos do gene alvo em relação a um gene de expressão constitutiva, foram amplificadas as sequências dos *primers* β ACTINA e GAPDH e o que apresentou menor coeficiente de variação foi utilizado como referência endógena, e um grupo calibrador (grupo controle negativo).

Os produtos amplificados foram analisados em gel de agarose a 1,5% e corados com brometo de etídio, para a verificação dos tamanhos dos fragmentos, especificidade das reações e validação dos resultados obtidos pela PCR em tempo real.

As análises de quantificação relativa dos transcrito de β-ACTINA, HSP70.1A, HSBP1, HSP27.P1, BAX, BCL2 e WNT5A, foi feita pelo *Relative Expression Software Tool* (REST®) (PFAFFL, HORGAN e DEMPFLER, 2002) que possui o modelo estatístico *Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation TEST*® (versão 384 - Beta, 2005), utilizado para analisar os dados obtidos da quantificação relativa da PCR em Tempo-Real.

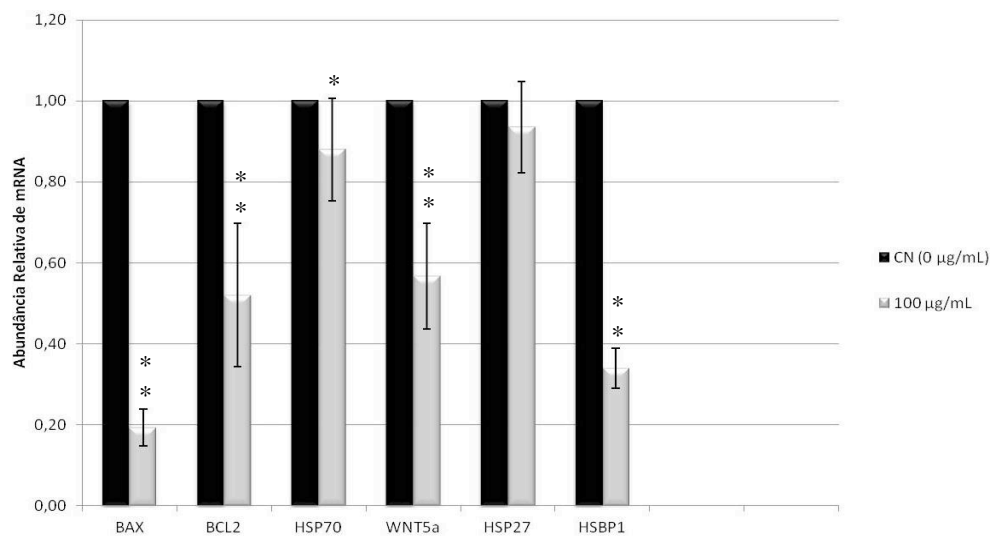
## Resultados e Discussão

Comparando-se a abundância dos transcritos no tratamento de 50 µg/mL com o controle, todos os transcritos foram subregulados (P<0,05; P<0,001) (Figura 1).



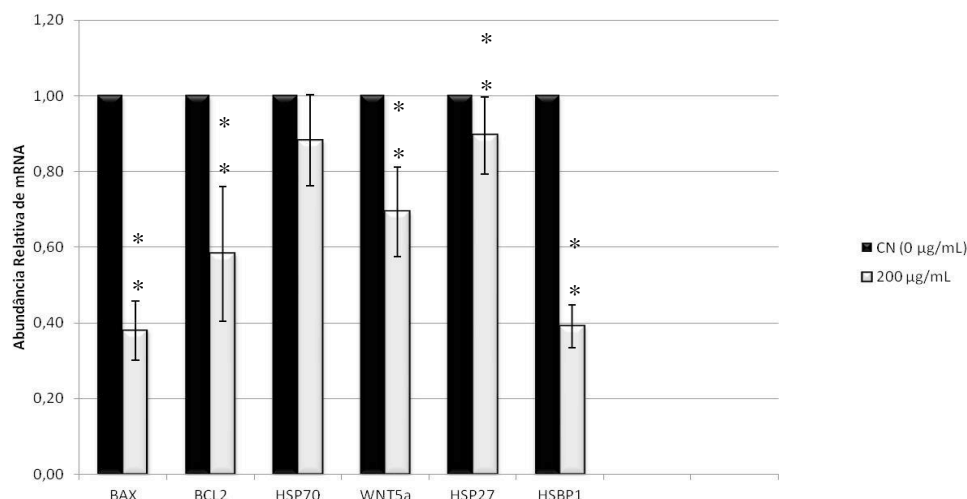
**Figura 1.** Abundância relativa dos transcritos no tratamento de 50 µg/mL. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão da média (EPM), utilizando-se como calibrador o grupo controle negativo (0 µg/mL), com valor igual a 1. Diferenças significativas entre os grupos são indicados por \*para  $P < 0,05$  e \*\*para  $P < 0,001$ .

No tratamento de 100 µg/mL, observou-se menor abundância de transcritos ( $P < 0,05$ ) da maioria dos genes de reposta ao estresse (HSP70.1A, WNT5a, HSBP1) e dos relacionados ao processo de apoptose (BCL-2, BAX), sendo o HSP27.P1 o único transcrito que não apresentou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em relação controle negativo (Figura 2).



**Figura 2.** Abundância relativa dos transcritos no tratamento de 100 µg/mL. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão, utilizando-se como calibrador o grupo controle negativo (0 µg/mL), com valor igual a 1. Diferenças significativas entre os grupos são indicados por \*para  $P < 0,05$  e \*\*para  $P < 0,001$ .

Para o tratamento de 200 µg/mL, também foi observada menor abundância de transcritos ( $P < 0,05$ ) da maioria dos genes de reposta ao estresse (HSP27, WNT5a, HSBP1) e os dois relacionadas à apoptose (BCL-2, BAX), sendo o HSP70.1A o único que não apresentou diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) em relação controle negativo (Figura 3).



**Figura 3.** Abundância relativa dos transcritos para o tratamento 200 µg/mL. Os resultados estão demonstrados em média e erro padrão, utilizando-se como calibrador o grupo controle negativo (0 µg/mL), com valor igual a 1. Diferenças significativas entre os grupos são indicados por \*\* para  $P < 0,001$ .

A partir das análises das curvas de dissociação dos genes avaliados, não foram observados picos referentes a dímeros de *primers* ou produtos inespecíficos da PCR. Além desta análise, a partir da técnica de eletroforese em gel de agarose (1,5%) houve a confirmação da presença e tamanho dos produtos, sendo possível realizar a validação dos resultados. Todos os transcritos dos genes estudados foram identificados e apresentaram o tamanho esperado.

Pelo fato de a maior parte dos genes de estresse aqui avaliados ter se apresentado *down regulated* nas condições a que as células foram submetidas, o extrato etanólico da planta *Azadirachta indica* pode ter proporcionado alterações na expressão dos mesmos. Isto pode também estar relacionado a vias de inibição dos transcritos ou a degradação dos mesmos.

Entretanto, além destes fatores, a subregulação, neste caso, pode também ter sofrido influência de outras vias. Estudos revelaram que uma das características que distinguem células quiescentes de não-quiescentes, são a falta de ciclina D e expressão da ciclina E, a cromatina altamente condensada e menor quantidade de ribossomos que, por sua vez, implicam em uma diminuição de mRNAs e proteínas, quando comparados á homólogos (LARSSON et al., 1986). Portanto, este fator pode ter relação com a baixa expressão dos genes avaliados nos fibroblastos expostos ao extrato etanólico de *Azadirachta indica*, que se encontravam em quiescência, quando comparados ao grupo controle, onde as células estavam em condições de proliferação.

## Conclusões

A busca por novos métodos que sejam eficientes em sincronizar o ciclo de células somáticas e que não produzam efeitos tóxicos às células, tem se tornado cada vez mais importante, pois o sucesso da técnica de Transferência Nuclear com Célula Somática depende, em grande parte, da fase em que o núcleo doador se encontra.

As análises dos resultados de expressão dos genes avaliados pelo presente trabalho indicam que, possivelmente, nas concentrações administradas, o extrato etanólico de *Azadirachta indica* provoca alterações na expressão de determinados genes, sendo necessários outros estudos para determinar o real efeito citotóxico deste extrato e a viabilidade das células após a exposição ao mesmo.

## Agradecimentos

A Fapemig.

## Literatura citada

CAMPBELL, K. H. S.; LOI, P.; OTAEGUI, P. J.; WILMUT, I. Cell cycle co-ordination in embryo cloning by nuclear transfer. **Reviews of Reproduction**, n. 1, p. 40-46, 1996.

HEYMAN, Y.; CHAVATTE-PALMER, P.; LEBOURHIS, D.; CAMOUS, S.; VIGNON, X.; RENARD, J. P. Frequency and Occurrence of Late-Gestation Losses from Cattle Cloned Embryos. **Biology of Reproduction**, v. 66, p. 6-13, 2002.

KUES, W. A.; ANGER, M.; CARNWATH, J. W.; PAUL, D.; MOTLIK, J.; NIEMANN, H. Cell cycle synchronization of porcine fetal fibroblasts: effects of serum deprivation and reversible cell cycle inhibitors. **Biology of Reproduction**, v. 62, n. 2, p. 412-419, 2000.

KUMAR, S.; SURESH, P. K.; VIJAYABABU, M. R.; ARUNKUMAR, A.; ARUNAKARAN, J. Anticancer effects of ethanolic extract on prostate cancer cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 246-250, 2006.

LARSSON. O.; DAFGARD. E.; ENGSTRÖM, W.; ZETTERBERG, A. Immediate effects of serum depletion on dissociation between growth in size and cell division in proliferating 3T3 cells. **J. Cell. Physiol.**, v. 127, p. 267-273, 1986.

PFAFFL, M. W.; HORGAN, G. W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST®) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 9, p. 26-36, 2002.

RAO, P. N. The discovery (or rediscovery?) of the phenomenon of premature chromosome condensation. **BioEssays**, v. 12, p. 193-197, 1990.

SOLTER, D. MAMMALIAN CLONING: ADVANCES AND LIMITATIONS. **Nature Reviews/Genetics**, v. 1, p. 199, 2000.

WILMUT, I.; YONG, L.; CAMPBELL, K. H. Embryonic and somatic cell cloning. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 10, n. 7-8, p. 639-643, 1998.

ROZEN, S.; SKALETSKY, H.. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. **Methods in Molecular Biology**, v. 132, p. 365-386, 2000.



# Efeitos da adição de coprodutos do biodiesel na fermentação ruminal *in vitro*, cinética de digestão e produção de metano

Paula Pereira Ribeiro de Moura<sup>1</sup>, Larissa Gomes dos Reis<sup>2</sup>, Ellen Almeida Moreira<sup>3</sup>, Carollina Banni Alevato<sup>4</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>5</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>5</sup>, Fernando Cesar Ferraz Lopes<sup>6</sup>, Heloisa Carneiro<sup>5</sup>, Alexandre Vieira Chaves<sup>7</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do Curso de Farmácia UFJF – Bolsista PIBIC –Fapemig; <sup>2</sup> Graduanda do Curso de Farmácia - UFJF – Bolsista PIBIC - CNPq; <sup>3</sup>Biomédica - Bolsista DT13 - CNPq ; <sup>4</sup>Biomédica - Bolsista ATP - CNPq; <sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite; <sup>6</sup>Analista da Embrapa Gado de Leite; <sup>7</sup>Professor da Universidade de Sydney

**Resumo:** Nos últimos anos vem ocorrendo uma crescente utilização de coprodutos do biodiesel nas dietas dos ruminantes. O objetivo deste estudo foi determinar os efeitos da adição de coprodutos do biodiesel na fermentação ruminal *in vitro* e produção de metano para o feno de *Brachiaria brizantha* isoladamente (controle) e em combinação com sete coprodutos do biodiesel (farelo de soja, farelo de moringa, farelo de mamona, torta de algodão, torta de pinhão manso, torta de girassol, torta de nabo forrageiro e glicerina) nas relações de 9:1 8:2 e 6:4 para cada tratamento, em 48 h de incubação *in vitro*. O volume de gases produzido foi mensurado após 6, 12, 24 e 48 h e a produção de metano às 6 e 12 h após o início da fermentação. Mensurou-se as concentrações de ácidos orgânicos e a digestibilidade *in vitro* da matéria seca após 48 h de fermentação. O nível de inclusão dos coprodutos influenciou positivamente os valores de DIVMS ( $P < 0,05$ ). A inclusão da torta de moringa permitiu a redução na produção de metano, enquanto a adição de glicerina aumentou a produção de metano.

**Palavras-chave:** fermentação ruminal, metano, sementes oleaginosas, suplementação

**Abstract:** In recent years has been occurring an increasing use of biodiesel co-products in ruminant diets. The objective of this study was to determine the effects of co-products addition on *in vitro* rumen fermentation and methane production for *Brachiaria brizantha* hay incubated alone (control) and in combination with seven biodiesel co-products (soy bean meal, moringa meal, castor bean meal, cotton cake, Jatropha cake, sunflower cake, radish cake and glycerin) at the ratios 9:1, 8:2 and 6:4 for each treatment, with 48 hours of incubation. Samples of each treatment were collected at 6, 12, 24 and 48 h for determining the cumulative gas production. The methane production was measured at 6 and 12 h. The VFA (volatile fatty acid) and *in vitro* digestibility of dry matter (IVDDM) was measured at 48h. The inclusion of by-products increased the IVDDM. The inclusion of moringa oil seed allowed a reduction in methane production while the addition of glycerin increased production of methane.

**Keywords:** methane, press oil seeds, ruminal fermentation, supplementation.

## Introdução

O metano é o principal gás de efeito estufa produzido a partir de atividades relacionadas à pecuária, respondendo por 37% do total das emissões mundiais de CH<sub>4</sub> antropogênico e de 3 a 5% de todos os gases relacionado ao efeito estufa em equivalentes CO<sub>2</sub> (MACHADO et al., 2011). A produção de metano entérico pelos microrganismos ruminais é essencial para a degradação efetiva da matéria orgânica, mas também representa perda energética pelo ruminante em relação a energia bruta consumida. Conseqüentemente, estratégias de mitigação, não só beneficiam o meio ambiente, mas também a eficiência de produção do animal.

A produção de biodiesel gera dois importantes coprodutos: as tortas e farelos de oleaginosas e a glicerina. Tais coprodutos vêm tornando-se uma fonte promissora de

proteína e ou energia na alimentação dos ruminantes, apresentando potencial como estratégia de mitigação de metano entérico, seja pela melhoria das características fermentativas ou pela presença de óleo residual. O objetivo do presente trabalho foi estudar os efeitos da adição de coprodutos do biodiesel na fermentação ruminal *in vitro* e na produção de metano no feno de *Brachiaria brizantha*.

## Material e Métodos

O substrato utilizado nas incubações *in vitro* foi o feno de *Brachiaria brizantha* (controle) com ou sem a adição de 100, 200 ou 400 mg de sete diferentes coprodutos do biodiesel ( $\text{kg}^{-1}$  de matéria seca, MS): farelo de soja, farelo de moringa, farelo de mamona, torta de algodão, torta de pinhão manso, torta de girassol, torta de nabo forrageiro e glicerina. Os ingredientes da ração foram secos a 55 °C por 24 horas, moídos e misturados para obter os 24 tratamentos. Os substratos foram preparados nas proporções 10:0, 9:1, 8:2 e 6:4 (de *Brachiaria brizantha*: coprodutos, base MS) para cada tratamento. Em cada saco de incubação foi pesado 0,5 g de MS, em triplicata, e posteriormente foram colocados em frasco âmbar (50 mL). O procedimento de incubação foi repetido duas vezes, resultando em um total de 6 frascos por tratamento. O inóculo foi obtido de três vacas fistuladas, sendo preparado pela mistura de líquido ruminal e um tampão mineral em uma proporção de 1:3. O inóculo (25 mL) foi então transferido para o frasco sob fluxo de nitrogênio livre de oxigênio. Os frascos foram então vedados com rolhas de borracha e lacrados com anilhas de alumínio, e permaneceram sob agitação em agitador orbital a 39°C. Após 6, 12, 24 e 48h de incubação foi realizada a medição da produção de gases e após 6 e 12h a coleta para análise de metano. A produção de gases foi medida em aparato vaso comunicante e a coleta de metano foi realizada com o auxílio de uma seringa de 20 mL que permitiu a transferência dos gases produzidos para exetainers, para posteriormente ser analisado por meio de cromatografia gasosa (FEDORAK E HRUDEY, 1983). Os sacos com os resíduos foram lavados com água destilada e secos a 55 °C por 48 h, até peso constante para estimar o desaparecimento *in vitro* da matéria seca (DIVMS).

A composição bromatológica dos tratamentos encontra-se na Tabela 1. Destacaram-se os coprodutos do algodão, da moringa e da soja pelos elevados teores de proteína bruta. Alguns coprodutos (nabo forrageiro, pinhão manso e girassol) apresentaram elevados teores de extrato etéreo, evidenciando possível ineficiência no processo de extração do óleo para produção de biodiesel. A torta de mamona apresentou elevado teor de cinzas, o que provavelmente está relacionada ao processo de destoxificação utilizado, que envolveu a aplicação de cal virgem (óxido de cálcio).

**Tabela 1.** Matéria Seca e composição química do feno de *B. brizantha* e coprodutos do biodiesel.

	MS, g $\text{kg}^{-1}$	MS ( $\text{g kg}^{-1}$ )							
		PB	FDN	NFC	FDA	LDA	Cinza	EE	NIDA
Feno de <i>B. brizantha</i>	903.4	121.1	652.2	92.1	354.6	41.1	111.2	23.4	1.8
Farelo de Soja	869.9	528.4	234.9	152.4	243.8	125.9	66.0	18.3	23.8
Farelo de Mamona	912.6	320.2	467.4	58.6	383.4	154.4	110.0	43.8	20.3
Torta de Algodão	922.8	549.9	277.0	64.5	247.7	109.9	68.3	40.3	13.5
Farelo de Moringa	905.2	577.1	202.7	85.6	80.5	33.3	49.8	84.8	3.0
Torta de Pinhão Manso	928.7	356.9	391.4	61.6	364.5	167.5	79.5	110.6	8.9
Torta e Nabo forrageiro	935.6	393.7	279.7	4.9	154.2	69.6	41.3	280.4	5.6
Torta de Girassol	914.5	329.4	439.7	27.6	384.0	120.4	41.3	162.0	7.6
DP	20.18	151.79	149.98	44.35	114.70	49.97	27.92	89.31	8.01

MS, matéria seca; PB, proteína bruta; FDN e FDA, fibra em detergente neutro e ácido; LDA, lignina em detergente ácido; EE, extrato etéreo; NIDA, nitrogênio insolúvel em detergente; DP, desvio padrão.

Foi utilizado procedimento univariado por meio do software SAS para testar a distribuição normal dos dados. Os dados foram analisados considerando delineamento inteiramente casualizado usando o PROC MIXED. A interação ensaio x nível x suplemento foi usada para testar o efeito do tratamento. Diferenças entre as médias foram testadas utilizando o teste de hipótese linear dos quadrados mínimos ( $P < 0,05$ ).

### Resultados e Discussão

Para a produção de gases 48 h ( $\text{mL g}^{-1}$  MSD) a interação nível x coproduto não foi significativa ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2). A DIVMS ( $\text{g kg}^{-1}$  MS) foi influenciado pela interação nível x suplemento ( $P < 0,01$ ). Em cada nível de substituição, glicerina e farelo de manona apresentaram a maior e a menor DIVMS, respectivamente ( $P < 0,01$ ).

A inclusão de farelo de moringa propiciou a menor quantidade de gás ( $P < 0,05$ ), quando comparado com os demais tratamentos.

**Tabela 2.** Erro padrão e níveis de significância do nível de inclusão do coproduto, do coproduto e da interação nível x coproduto.

	EP	Nível	Coproduto	Nível x coproduto
Gás 48h, $\text{mL g}^{-1}$ MSD	36,42	0,01	$< 0,01$	0,43
Metano 6h, $\text{mg g}^{-1}$ MSD	0,2	0,23	$< 0,01$	0,11
Metano 12h, $\text{mg g}^{-1}$ MSD	0,57	0,57	$< 0,01$	0,07
DIVMS, $\text{g kg}^{-1}$ MS	11,69	0,03	$< 0,01$	$< 0,01$

O tratamento envolvendo a inclusão de farelo de moringa apresentou a menores produções de gases ( $\text{mL g}^{-1}$  MSD) às 48 h (Tabela 3). Geralmente, a produção de gases é um reflexo da eficiência e grau de degradabilidade, sugerindo que os suplementos que apresentaram alta degradabilidade ruminal de matéria seca devem também apresentar alta produção de gases. No entanto, no presente estudo, o farelo de moringa apresentou baixa produção de gases e elevada degradabilidade da MS, conforme pode ser observado no trabalho complementar a esse de autoria de Reis et al., (2012a).

**Tabela 3** – Efeitos da adição de coprodutos do biodiesel sobre as características de fermentação ruminal *in vitro*.

Coproduto	Gas 48h, $\text{mL g}^{-1}$ MSD	Metano, $\text{mg g}^{-1}$ MSD	
		6 h	12 h
Torta de Mamona	141.9 <sup>b</sup>	1.8 <sup>d</sup>	4.2 <sup>cd</sup>
Torta de Algodão	158.5 <sup>ab</sup>	2.3 <sup>bc</sup>	5.6 <sup>d</sup>
Glicerina	147.3 <sup>ab</sup>	2.7 <sup>a</sup>	7.9 <sup>a</sup>
Farelo de Moringa	116.4 <sup>c</sup>	1.7 <sup>d</sup>	3.5 <sup>d</sup>
Torta de Pinhão	142.5 <sup>b</sup>	2.2 <sup>c</sup>	4.9 <sup>bc</sup>
Torta de nabo	148.0 <sup>ab</sup>	2.6 <sup>ab</sup>	5.6 <sup>b</sup>
Farelo de Soja	149.1 <sup>ab</sup>	2.3 <sup>bc</sup>	5.4 <sup>b</sup>
Torta de Girassol	142.1 <sup>b</sup>	2.3 <sup>c</sup>	5.2 <sup>b</sup>
Erro Padrão	35.60	0.12	0.42

<sup>a-d</sup> Médias com letras distintas diferem pelo teste de quadrados mínimos ( $P < 0.05$ ); MSD, matéria seca digestível.

Houve efeito de coproduto sobre a produção de  $\text{CH}_4$  ( $P < 0,05$ ) com glicerina produzindo a maior quantidade de  $\text{CH}_4$  nas 6 e 12 h de incubação, já o tratamento envolvendo o farelo de moringa e mamona exibiram a menor ( $P < 0,05$ ) produção de  $\text{CH}_4$ . O farelo de mamona, apesar de ter apresentado menores produções de  $\text{CH}_4$ , obtiveram valores de degradabilidade da MS e PB muito baixos (REIS et al., 2012a; REIS et al., 2012b), compatíveis com os valores comumente encontrados para alimentos de baixo valor nutritivo. A baixa produção de metano obtida para os tratamentos com farelo de moringa, pode ser explicada pela presença de polieletrólito catiônico que

apresenta propriedades antibacterianas. É amplamente aceito que alimentos que têm maior DIVMS também tendem a ter maiores emissões de CH<sub>4</sub>. Neste estudo, os suplementos com o valor de DIVMS maior (glicerina) e menor (farelo de mamona) DIVMS (g kg<sup>-1</sup> MS) apresentaram a maior e a menor produção de CH<sub>4</sub> (mg g<sup>-1</sup> MSD), respectivamente, nas 6 e 12 h de incubação. Variações nas emissões de CH<sub>4</sub> refletem a diferença na composição das dietas como o alto conteúdo de carboidratos solúveis que favorece a produção de propionato e, o processo de competição na metanogênese, reduzindo assim a produção de metano por unidade de matéria orgânica fermentável (BEAUCHEMIN AND MCGINN, 2005). No entanto, vias de fermentação que favorecem o aumento da produção de acetato resultam em maiores perdas de energia na forma de CH<sub>4</sub> (Alexander et al., 2008). No presente estudo o farelo de moringa apresentou a menor produção de CH<sub>4</sub> (mg g<sup>-1</sup> MS), apesar da proporção acetato:propionato ser semelhante aos demais tratamentos. A inclusão de glicerina apresentou os menores valores de proporção A:P apesar de apresentar a maior produção de CH<sub>4</sub>, ou seja a relação acetato:propionato não teve efeito direto sobre o aumento da produção de metano.

## Conclusões

Este estudo forneceu uma avaliação dos efeitos das sementes oleaginosas sobre as características da fermentação *in vitro* e a produção de CH<sub>4</sub>. Foram observadas interações entre o tipo de suplemento e o nível de suplementação de DIVMS. O tipo de suplemento apresentou um efeito significativo sobre os parâmetros de fermentação ruminal e produção de CH<sub>4</sub>. A adição de sementes oleaginosas de moringa proporcionaram a menor produção de CH<sub>4</sub> sem comprometer a degradação de nutrientes, indicando que este subproduto de biodiesel poderia ser incluído na dieta de ruminantes, como uma estratégia para mitigar as emissões de CH<sub>4</sub>.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura Citada

- BEAUCHEMIN, K. A., MCGINN, S. M. Methane emissions from feedlot cattle fed barley or corn diets. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 653-661, 2005.
- MACHADO, F. S.; PEREIRA, L. G. R.; GUIMARÃES JÚNIOR, R.; LOPES, F. C. F.; CHAVES, A. V.; CAMPOS, M. M.; MORENZ, M. J. F. **Emissões de metano na pecuária: conceitos, métodos de avaliação e estratégias de mitigação**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2011. 92 p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos 147).
- REIS, L.G. et al. Degradabilidade *in situ* da matéria seca de coprodutos do biodiesel. In: Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite, 11., 2012, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012a.
- REIS, L.G. et al. Degradabilidade *in situ* de proteína bruta de coprodutos do biodiesel. In: Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite, 11., 2012, Juiz de Fora. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2012b.

# Degradabilidade *in situ* da proteína bruta de coprodutos do biodiesel

Larissa Gomes dos Reis<sup>1</sup>, Paula Pereira Ribeiro de Moura<sup>2</sup>, Ellen Almeida Moreira<sup>3</sup>, Carolina Banni Alevato<sup>4</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>5</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>5</sup>, Fernando Cesar Ferraz Lopes<sup>5</sup>, Heloisa Carneiro<sup>5</sup>, Alexandre Vieira Chaves<sup>6</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do Curso de Farmácia – UFJF – Bolsista PIBIC- CNPq; <sup>2</sup>Graduanda do curso de Farmácia UFJF – Bolsista PIBIC – Fapemig; <sup>3</sup>Biomédica- Bolsista DT13- CNPq; <sup>4</sup>Biomédica- Bolsista ATP- CNPq; <sup>5</sup> Embrapa Gado de Leite; <sup>6</sup>Professor da Universidade de Sydney

**Resumo:** A crescente produção de biodiesel tornou possível a utilização dos coprodutos gerados. O estudo objetivou avaliar a degradabilidade *in situ* de proteína bruta seis coprodutos (farelo de moringa, farelo de mamona, torta de algodão, torta de nabo forrageiro, torta de pinhão manso, e torta de girassol) Foram incubados três sacos de náilon, por tratamento no rúmen de três vacas fistuladas. Os tempos de fermentação foram 0, 3, 6, 12, 24, 48 e 96h. A taxa de degradação (k) para PB mais rápida foi observada para moringa e girassol, assim como a melhor degradabilidade efetiva de PB (DE<sub>PB</sub>).

**Palavras-chave:** cinética de degradação, degradabilidade, farelo de sementes oleaginosas, subprodutos.

**Abstract:** The growing production of biodiesel made possible the use of co-products generated. The study aimed to evaluate the degradability *in situ* of crude protein of six co-products (soy bean meal, moringa meal, castor bean meal, cotton cake, Jatropha cake, sunflower cake, radish cake). Were incubated three nylon bags per treatment in rumen of fistulated cow. The fermentation times were 0, 3, 6, 12, 24, 48 and 96h. The higher degradation rate (k) of CP was found to moringa and sunflower, as well as improved effective degradability of CP (ED<sub>CP</sub>).

**Keywords:** by-products, degradation kinetics, degradability, pres oil seeds.

## Introdução

Alguns aspectos destacam-se na cadeia do biodiesel como as questões relacionadas às matérias-primas e ao processo de produção industrial. Na fabricação de biodiesel são produzidos ésteres (biodiesel) e glicerina, e alguns coprodutos (torta, farelo, etc.) que podem constituir de importante fonte de renda aos produtores. A torta ou farelo gerado na extração do óleo não passam por processo de agregação de valor, uma vez que suas potencialidades nutricionais e econômicas ainda são desconhecidas, salvo algumas exceções como soja, algodão e girassol (Abdalla et al, 2008). Entre as plantas oleaginosas, aparecem como culturas emergentes ou potenciais para produção de biodiesel, o algodão, o pinhão manso, a moringa, a mamona, o girassol e o nabo forrageiro.

Objetivou-se neste trabalho, avaliar a degradabilidade *in situ* da proteína bruta (PB) de coprodutos do biodiesel.

## Material e Métodos

Os coprodutos avaliados foram: farelo de mamona (Família Euphorbiaceae; *Ricinus communis*), torta de algodão (Família Malvaceae; *Gossypium hirsutum* L), farelo de moringa (Família Moringaceae; *Moringa oleifera* Lam.), torta de Pinhão Manso (Família Euphorbiaceae; *Jatropha curcas*), torta de nabo forrageiro (Família Brassicaceae; *Raphanus sativus* L. var Oleiformes), torta de girassol (Família Asteraceae; *Helianthus annuus*) e farelo de soja [Família Fabaceae (alt. Leguminosaeae; *Glycine max*)]. Os farelos foram oriundos do processamento por extração de óleo por solventes e as tortas por ação mecânica.

A avaliação dos teores de matéria seca (MS) e proteína bruta (PB) foram realizadas segundo metodologias descritas por SILVA e QUEIROZ (2002). Os valores de FDN e FDA foram determinados pelo método de Van Soest (1991) com inclusão de -amilase termicamente

estável. As concentrações de FDN e FDA foram corrigidas para cinzas. O teor de cinzas foi determinado após 2h de oxidação a 600°C em forno de mufla, método 942.05; (Associação Oficial de Química Analítica, 1990). A determinação do N total e N da fração insolúvel em detergente ácido (NIDA) segundo Silva e Queiroz (2002). A proteína bruta foi calculada como  $N \times 6.25$ . O teor de extrato etéreo (EE) foi avaliado por extração como éter dietílico, conforme método 920.39 (AOAC, 1990). Os carboidratos não fibrosos (CNF) foram calculados conforme a equação:  $CNF = 1.000 - [PB + FDN + EE + cinzas]$  (MERTENS, 2002).

Para a incubação *in situ*, foram utilizadas três vacas da raça holandês fistuladas no rúmen, com peso vivo médio de 450 kg, mantidos em pastagens de *Brachiaria brizantha* e suplementados com ração concentrada. As amostras dos coprodutos foram moídas em peneira de 2 mm.

Os alimentos moídos foram pesados em sacos de náilon, de modo a proporcionar cerca de 10 a 20 mg de amostra cm<sup>2</sup> de área útil dos sacos (NOCEK, 1988), em triplicata para cada alimento e os animais foram consideradas as repetições.

Os tratamentos (coprodutos) foram analisados em triplicata por tempo de incubação (0, 3, 6, 12, 24, 48, 96 h) e vaca. Os sacos foram colocados no fundo do rúmen, exceto os do tempo 0h de incubação. Depois de retirados, de acordo com o tempo de incubação, os sacos de náilon (inclusive os do tempo 0 h), contendo os resíduos das dietas avaliadas foram lavados por 30 minutos em um ciclo de água fria da máquina de lavar e, secos a 55 °C por 48 horas. Os sacos secos foram pesados e os resíduos foram moídos a 1 mm para análise de PB. O desaparecimento de PB foi analisado usando modelo não linear como descrito por Lopez et al (1999) para determinar a fração de desaparecimento ( $k$ , h<sup>-1</sup>) e o potencial de degradação ( $P$ ) de acordo com:  $P = A + B (1 - e^{-k(t-L)})$ , em que "A" é a fração solúvel, "B" é a fração insolúvel degradável,  $t$  é o tempo (h) e  $L$  é o tempo de colonização (h). A degradabilidade efetiva (DE) foi calculada a partir de parâmetros cinéticos obtidos pelo ajuste exponencial assumindo as taxas de passagem ( $k_p$ ) de 0.02, 0.05 e 0.08 h<sup>-1</sup>:  $ED = A + B \times (k / (k + k_p))$ . Diferentes taxas de passagem ( $k_p$ ) foram utilizadas com base na alimentação de manutenção, média e alta produção de vacas leiteiras, respectivamente.

Os dados de incubação *in situ* foram analisados usando um procedimento não linear de quadrados mínimos (PROC NLIN) (SAS, 2011) para estimar os parâmetros A, B e  $k$ , calculados pelos dados de desaparecimento de MS, e analisados segundo o modelo:  $ij = \bar{X} + i + ij$ , em que "ij" é o parâmetro observado,  $\bar{X}$  a média global, "i" o efeito dos tratamentos e  $ij$  o erro residual.

## Resultados e Discussão

A composição bromatológica está apresentada na Tabela 1. O conteúdo de proteína bruta na dieta é de essencial importância para atividade microbiana. O mínimo de 70 g PB kg<sup>-1</sup> MS é requerido para que a digestão seja eficiente. (HARIADI E SANTOSO, 2010). Todas as forragens e subprodutos utilizados no estudo apresentaram PB acima desse nível. Destacaram-se os coprodutos do algodão, da moringa e da soja pelos elevados teores de proteína bruta. Alguns coprodutos (nabo forrageiro, pinhão manso e girassol) apresentaram elevados teores de extrato etéreo, evidenciando possível ineficiência no processo de extração do óleo para produção de biodiesel. A torta de mamona apresentou elevado teor de cinzas, o que provavelmente esta relacionada ao processo de destoxificação utilizado, que envolveu a aplicação de cal virgem (óxido de cálcio).

Tabela 1. Matéria Seca e composição química das dietas experimentais.

	MS (g kg <sup>-1</sup> )								
	MS, g kg <sup>-1</sup>	PB	FDN	NFC	FDA	LDA	Cinza	EE	NIDA
<i>Brachiaria brizantha</i>	903.4	121.1	652.2	92.1	354.6	41.1	111.2	23.4	1.8
Farelo de Soja	869.9	528.4	234.9	152.4	243.8	125.9	66.0	18.3	23.8
Sementes oleaginosas:									
Mamona	912.6	320.2	467.4	58.6	383.4	154.4	110.0	43.8	20.3
Algodão	922.8	549.9	277.0	64.5	247.7	109.9	68.3	40.3	13.5
Moringa	905.2	577.1	202.7	85.6	80.5	33.3	49.8	84.8	3.0
Pinhão manso	928.7	356.9	391.4	61.6	364.5	167.5	79.5	110.6	8.9
Nabo forrageiro	935.6	393.7	279.7	4.9	154.2	69.6	41.3	280.4	5.6
Girassol	914.5	329.4	439.7	27.6	384.0	120.4	41.3	162.0	7.6
DP	20.18	151.79	149.98	44.35	114.70	49.97	27.92	89.31	8.01

MS, matéria seca; PB, proteína bruta; FDN e FDA, fibra em detergente neutro e ácido; LDA, lignina em detergente ácido; EE, extrato etéreo; NIDA, nitrogênio insolúvel em detergente; DP, desvio padrão

O conteúdo de PB no presente estudo foi maior para farelo de moringa, resultando em maiores taxa de desaparecimento e degradabilidade efetiva. A DE do farelo de moringa se compara à da torta de girassol, apesar da última apresentar menor conteúdo de PB. Esse resultado pode ser atribuído a maior fração solúvel de PB da torta de girassol, que embora em menor quantidade, se apresenta mais prontamente disponível. A torta de algodão, apesar do alto conteúdo de PB, apresentou baixa DE. As concentrações de PB em torta de girassol e farelo de mamona foram semelhantes, apesar de terem apresentarem a maior e menor taxa de desaparecimento de PB ( $P < 0.05$ ). A variação da degradabilidade de proteína bruta pode se referir a diferença na proporção de proteína estrutural e não estrutural e das frações de carboidratos, afetando sua disponibilidade e solubilidade.

**Tabela 2.** Características de degradação de proteína bruta das dietas (g kg<sup>-1</sup>) definidas pelas frações: solúvel (A), insolúvel degradável (B), resíduo não degradável (C = 1000–A–B), taxa de desaparecimento (k, h<sup>-1</sup>), degradabilidade efetiva (DEMS) e fase lag (h).

	A	B	C	k	Degradabilidade Efetiva (DE <sub>pg</sub> )			
					(k <sub>p</sub> = 0.02)	(k <sub>p</sub> = 0.05)	(k <sub>p</sub> = 0.08)	Lag
<i>Brachiaria brizantha</i>	193.4 <sup>g</sup>	385.0 <sup>ef</sup>	421.6 <sup>a</sup>	0.068 <sup>a</sup>	485.4 <sup>f</sup>	408.4 <sup>h</sup>	363.8 <sup>g</sup>	2.2 <sup>c</sup>
Farelo de Soja	340.0 <sup>e</sup>	660.0 <sup>a</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.038 <sup>f</sup>	859.8 <sup>c</sup>	680.8 <sup>f</sup>	593.9 <sup>e</sup>	4.5 <sup>a</sup>
Sementes oleaginosas:								
Mamona	249.9 <sup>f</sup>	351.0 <sup>f</sup>	399.1 <sup>a</sup>	0.106 <sup>d</sup>	543.8 <sup>e</sup>	486.5 <sup>g</sup>	448.0 <sup>f</sup>	3.0 <sup>b</sup>
Algodão	475.3 <sup>b</sup>	524.7 <sup>c</sup>	0.0 <sup>d</sup>	0.041 <sup>f</sup>	833.1 <sup>d</sup>	715.1 <sup>e</sup>	655.7 <sup>d</sup>	3.3 <sup>b</sup>
Moringa	369.9 <sup>d</sup>	583.0 <sup>b</sup>	47.1 <sup>c</sup>	0.286 <sup>b</sup>	912.1 <sup>a</sup>	861.1 <sup>b</sup>	819.5 <sup>b</sup>	0.3 <sup>d</sup>
Pinhão manso	485.1 <sup>ab</sup>	420.0 <sup>de</sup>	94.9 <sup>b</sup>	0.103 <sup>d</sup>	836.5 <sup>d</sup>	767.5 <sup>d</sup>	721.1 <sup>c</sup>	0.3 <sup>d</sup>
Nabo forrageiro	496.7 <sup>a</sup>	444.0 <sup>d</sup>	59.3 <sup>c</sup>	0.208 <sup>c</sup>	901.0 <sup>b</sup>	853.2 <sup>c</sup>	815.7 <sup>b</sup>	0.5 <sup>d</sup>
Girassol	397.0 <sup>c</sup>	533.0 <sup>c</sup>	70.0 <sup>bc</sup>	0.425 <sup>a</sup>	906.1 <sup>ab</sup>	873.6 <sup>a</sup>	845.1 <sup>a</sup>	0.3 <sup>d</sup>
Erro Padrão	7.5	13.2	9.8	0.0092	3.4	2.8	3.7	0.21

a-g Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos ( $P < 0.01$ ).

## Conclusões

Destacam-se, entre os coprodutos testados o farelo de moringa e a torta de girassol, que apresentaram conteúdo de proteína bruta e digestibilidade maiores que o farelo de soja, controle positivo utilizado.

## Agradecimentos

A Fapemig.

## Literatura Citada

ABDALLA, A. L. FILHO, J.C.S., GODOI, A.R., CAROMO, C.A., EDUARDO, J.L.P. Utilização de subprodutos da indústria de biodiesel na alimentação de ruminantes. **R. Bras. Zootec.**, Viçosa, v. 37, n. spe, July 2008 AOAC. 1990. **Official methods of analysis** (15th edn), Gaithersburg, MD.

HARIADI, B. T., and B. SANTOSO. 2010. Evaluation of tropical plants containing tannin on in vitro methanogenesis and fermentation parameters using rumen fluid. **J. Sci. Food Agric.** 90: 456-461.

LOPEZ, S., J. FRANCE, M. S. DHANOA, F. MOULD, and J. DIJKSTRA. 1999. Comparison of mathematical models to describe disappearance curves obtained using the polyester bag technique for incubating feeds in the rumen. **J. Anim. Sci.** 77: 1875-1888.

MAKKAR, H. P. S., K. BECKER, F. SPORER, and M. WINK. 1997. Studies on nutritive potential and toxic constituents of different provenances of *Jatropha curcas*. **J. Agric. Food Chem.** 45: 3152-3157.

MERTENS, D. R. 2002. Gravimetric determination of amylase-treated neutral detergent fiber in feeds with refluxing in beakers or crucibles: Collaborative study. **J.A.O.C. Int.** 85.

MULROONEY, C. N., D. J. SCHINGOETHE, K. F. KALSCHEUR, and A. R. HIPPEN. 2009. Canola meal replacing distillers grains with solubles for lactating dairy cows. **J. Dairy Sci.** 92: 5669-5676.

SAS. 2011. **Sas onlinedoc**® 9.1.3 Sas inc., Cary, NC, USA.

VAN SOEST, P. J., J. B. ROBERTSON, and B. A. LEWIS. 1991. Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber and nonstarchpolysachharides in relation to animal nutrition. **J. Dairy Sci.** 74: 3583-3597.



## Tolerância diferencial de clones de capim elefante ao alumínio tóxico

Marlene Aparecida Cantarino<sup>1</sup>; Carlos Eugênio Martins<sup>2</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>2</sup>, Juarez Campolino Machado<sup>2</sup>, Fernando Teixeira Gomes<sup>3</sup>, Alexandre Magno Brighenti<sup>2</sup>; Anne Caroline Barbosa de Carvalho<sup>4</sup>, Ricardo Ottoni da Silva<sup>5</sup>; Leandro de Senna Monaia<sup>5</sup>; Taís Helena Silva de Oliveira<sup>6</sup>.

<sup>1</sup>Aluna de graduação em Biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora - Bolsistas PIBIC Fapemig/Embrapa Gado de Leite – Av. Luz do Interior, 345 –Bairro Estrela Sul – 36030-776 - Juiz de Fora/MG - marlene.cantarino@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, Dom Bosco, 36038-300, Juiz de Fora/MG – carlos.eugenio@embrapa.br

<sup>3</sup>Professor do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF) - Av. Luz do Interior, 345 –Bairro Estrela Sul – 36030-776 - Juiz de Fora/MG - ffgomes2002@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Aluna de mestrado em Ecologia – Universidade Federal de Juiz de Fora – Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário – Bairro São Pedro – 36036-900. Bolsista Capes.

<sup>5</sup> Biólogos formados pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF) - Av. Luz do Interior, 345 –Bairro Estrela Sul – 36030-776 - Juiz de Fora/MG.

<sup>6</sup> Aluna de graduação em Geografia – Universidade Federal de Juiz de Fora – Rua José Lourenço Kelmer, s/n, Campus Universitário – Bairro São Pedro – 36036-900. Bolsistas PIBIC Fapemig/Embrapa Gado de Leite.

**Agradecimentos:** a Fapemig

**Resumo:** A seleção de gramíneas forrageiras tolerantes ao alumínio tóxico é etapa indispensável em programas de melhoramento que procuram identificar materiais mais produtivos e de maior adaptabilidade em condições de estresse. Espécies e variedades diferem quanto à tolerância ao Al. Portanto, a identificação e a seleção de clones tolerantes são vantajosas para a agricultura. Com o objetivo de avaliar a resposta de 44 clones de Capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) ao alumínio tóxico foi realizado um experimento em casa de vegetação. Foi utilizado um delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Após a brotação da forrageira em substrato comercial, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 2 L de solução nutritiva. Durante os primeiros sete dias as plantas cresceram em solução nutritiva com metade da concentração de nutrientes recomendada, sem aplicação de alumínio. Depois desta etapa e durante 29 dias, promoveu-se, semanalmente, a troca da solução nutritiva, acrescida de 15 mg/L de alumínio. Foram avaliadas a produção de matéria verde e seca de parte aérea (MVPA e MSPA) e de raiz (MVR e MSR), a relação entre matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR), os incrementos no número de perfilhos (INP), no crescimento da parte aérea (IPA) e das raízes (IR), além do índice de seleção (IS). Existe variabilidade genética entre os 44 clones de *Pennisetum purpureum* para a tolerância ao alumínio. O BAG 68 (Cameroon), foi o que apresentou o menor valor de índice de seleção, evidenciando grande capacidade de adaptação a solos com maiores concentrações de alumínio. A produção de matéria seca da parte aérea, também, foi maior no BAG 68 (Cameroon).

**Palavras-chave:** Toxidez por alumínio, genética vegetal, melhoramento de forrageiras, produção de forragem, capim-elefante.

**Abstract:** The selection of aluminum tolerance tropical forage grass is an important step in a plant breeding program that aims to identify more productive genotypes with higher adaptability under stress conditions. Species and varieties differ in Al tolerance. Therefore, the identification and selection of tolerant genotypes are advantageous for the agricultural. With the aim of evaluating response of 44 clones of elephant grass (*Pennisetum purpureum*) to the toxic aluminum an experiment was realized at green house. Was used

the completely randomized design, with three replications. After the forage budding in commercial substrate, the seedlings were transferred for plastic vases with capacity for 2 L of nutritious solution. During the first week the plants grew in nutritious solution with half of the concentration of nutrients recommended, without aluminum application. After this stage and for 29 days, the nutrient solution was weekly changed, with addition of 15 mg/L of aluminum. Were evaluated the green matter production of shoots and roots (MVPA and MVR), the dry matter production of shoots and roots (MSPA and MSR), the ration between dry matter and green matter of shoots and roots (MSMVPA and MSMVR), the increase in the growth of shoot and roots (IPA and IR), the increase in the number of tillers (INP), and the selection index. There is genetic variability among the 44 clones of *Pennisetum purpureum* for the aluminum tolerance. The BAG 68 (Cameroon) presented the smallest selection index value, evidencing great adaptation capacity to soils with larger aluminum concentrations. The dry matter production of the shoot, also, was larger in BAG 68 (Cameroon).

**Keywords:** Aluminium toxicity, plant genetics, fodder breeding, forage production, elephant grass.

## Introdução

O baixo rendimento das culturas não adaptadas deve-se a elevada acidez e toxicidade por alumínio presente nos solos brasileiros destinados a produção vegetal (SOUZA, LOBATO, 2004). A grande concentração desse elemento nos solos ácidos afeta diretamente os processos fisiológicos e metabólicos de diversas espécies cultivadas as quais podem apresentar como principais fatores o retardamento do crescimento radicular e da parte aérea redução dos números de raízes laterais (MATIELLO et al., 2008).

Por afetar o alongamento e a divisão celular, a redução no crescimento radicular de plantas é considerada como principal efeito de níveis tóxicos de alumínio (Al). Para contornar este problema, a exploração do potencial genético dos cultivares tem sido usada, pois se sabe que espécies e variedades diferem na tolerância ao excesso de Al daí, a identificação e a seleção de genótipos tolerantes serem vantajosas, independentes do grau de tecnologia utilizado. A seleção de plantas tolerantes ao Al constitui-se numa técnica rápida e eficiente, visando à adaptação das plantas ao meio ambiente, permitindo manter a produtividade em níveis elevados e racionalizando o uso de insumos.

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) constitui uma planta perene da família *Poaceae*, de grande interesse econômico para a pecuária leiteira nacional, tem sido amplamente utilizado em decorrência de sua alta produtividade e valor nutritivo, apresentando ótima palatabilidade, além de elevado vigor e persistência. Entretanto, é considerada uma espécie muito exigente, não se adaptando a solos de baixa fertilidade e de elevada saturação por alumínio. Dentre as características negativas apresentadas se destaca o amarelamento das folhas pela interferência na biossíntese da clorofila, arroxamento nas bainhas, margens do limbo e atrofiamento (FOY, 1974; BEN et al., 1976; CODIGNOTTO et al., 2002; PEIXOTO et al., 2007). Porém, verifica-se a ocorrência de espécies com poder de tolerância a altas concentrações deste metal, devido a sua complexação com ácidos orgânicos exsudados pelo sistema radicular. O fato de espécies e variedades de capim elefante apresentar respostas diferenciais quando expostas a altas concentrações de alumínio, tem estimulado não só o seu cultivo como também o seu melhoramento genético visando selecionar clones mais tolerantes.

Há um número considerável de trabalhos que avaliaram o desenvolvimento de gramíneas forrageiras quanto à tolerância ao Al, especialmente, as espécies de *Brachiaria* sp. (WENZL et al., 2003, CANTARINO et al., 2011) e *Panicum maximum* (OLIVEIRA et al., 2000) e mais recentemente na espécie de *Pennisetum purpureum* (MARTINS et al., 2005). Martins et al. (2006) encontraram grande variabilidade genética entre os genótipos de capim-elefante para a tolerância ao alumínio, sendo as características peso seco de raízes (PSR) e incremento no crescimento de raízes (IR), as que não foram influenciados pela presença do alumínio em solução. Por outro lado, o número de perfilhos foi a característica mais

influenciada, passando de 1,4 para 5,6 perfilhos por plantas considerando a média dos dois tratamentos.

O objetivo deste experimento foi avaliar a resposta diferencial de 44 genótipos de capim-elefante ao Al tóxico.

### Material e Métodos

O experimento foi realizado em casa de vegetação na Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora/MG, entre 13 de setembro a nove de novembro de 2011.

Utilizou-se como planta indicadora, 44 clones (genótipos) de capim-elefante (*Pennisetum purpureum*, Schum.), pertencentes ao Banco Ativo de Germoplasma (BAG) e da Rede Nacional de Avaliação de Capim-Elefante (RENACE) vinculados ao programa de melhoramento genético de Capim-elefante da Embrapa Gado de Leite: BAG 54, BAG 69, BAG 57, BAG 75, BAG60, BAG03, BAG 11, BAG 26, BAG 35, BAG 28, BAG 21, BAG 39, BAG 33, BAG 25, BAG 32, BAG 02, BAG 29, BAG 23, BAG 10, BAG 27, BAG45, BAG 44, BAG 01, BAG 49, BAG 37, BAG20, BAG 05, BAG 50, BAG 53, BAG 17, BAG 18, BAG 07, BAG 55, BAG 12, BAG52, BAG 54, BAG 66, BAG 09, BAG 65, BAG 62, BAG 67, BAG61, BAG 64, BAG 68. Os genótipos BAG 68 (Cameroon) e Bag 23 (Napier SEA) foram utilizados como testemunhas. Nós dos diferentes clones foram colocados para brotar em bandejas contendo substrato comercial, irrigadas diariamente com água destilada. Após 21 dias, as plântulas que apresentavam homogeneidade quanto ao comprimento radicular e, quando possível, ao comprimento da parte aérea, foram selecionadas e transplantadas para vasos plásticos contendo dois litros de solução nutritiva (CLARK, 1975), aerada. Durante a transferência, foram medidos: comprimento inicial da raiz principal e da parte aérea. A temperatura no interior da casa de vegetação variou de 22 a 28 °C.

Os vasos plásticos foram pintados com tinta preta betuminosa e alumínica e internamente revestidos com uma sacola preta para evitar a passagem de luz e inibir o desenvolvimento de algas. Durante os primeiros 14 dias as plantas cresceram em solução nutritiva com metade da concentração de nutrientes recomendada, sem aplicação de alumínio. Daí em diante e durante 29 dias, promoveu-se, semanalmente, a troca da solução nutritiva (completa), acrescida de 15 mg/L de alumínio. Após o período mencionado, as plantas foram retiradas dos vasos, o sistema radicular foi seccionado da parte aérea, lavado com água destilada e seu comprimento novamente medido. Também foi medido o comprimento final da parte aérea. O excesso de umidade do sistema radicular foi retirado com papel absorvente, procedendo-se, em seguida, à pesagem e acondicionamento em sacos de papel para secagem em estufa de circulação forçada de ar (96 horas a 55 °C). Foram avaliados: a produção de matéria verde e seca da parte aérea e raízes (MVPA, MSPA, MVR e MSR), o incremento no crescimento da parte aérea e das raízes (IPA e IR), expresso pela diferença entre o crescimento final e o inicial, além do incremento no número de perfilhos (INP), também expresso pela diferença entre o número de perfilhos no final e no início do experimento. A partir dos atributos avaliados, determinou-se o índice de seleção (IS), bem como a relação entre a matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR).

Os índices de seleção são combinações lineares de valores fenotípicos, resultando numa medida que concentra um único valor, os atributos positivos e negativos de cada genótipo para vários caracteres. Por necessitarem das estimativas de variância e covariância genotípicas e fenotípicas dos caracteres, esses índices são mais indicados para programa de seleção recorrente (FARIAS, 2005).

Utilizou-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Cada unidade experimental consistiu de um vaso contendo uma planta. Foi efetuada a análise de variância dos resultados e aplicação do teste de médias (SCOTT-KNOTT, 1974), a 5 % de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Os resultados de matéria verde e seca de parte aérea (MVPA e MSPA) e de raiz (MVR e MSR), a relação entre matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR), os incrementos no número de perfilhos (INP), na parte aérea (IPA) e na raiz (IR), além do índice de seleção (IS), em 44 clones de capim-elefante, encontram-se descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Produção de matéria verde e seca da parte aérea (MVPA, MSPA) e raízes (MVR, MSR), relação entre a matéria seca e verde de parte aérea (MSMVPA) e raízes (MSMVR) e incremento no número de perfilhos (INP), de 44 clones de capim-elefante.

Clones	MVPA	MSPA	MVR	MSR	MSMVPA	MSMVR	INP	IPA	IR	IS
BAG 68	105,37 a	13,69 a	31,97 b	3,35 a	0,13 a	0,10 a	3 a	106,4 a	43,7 a	115
BAG 55	112,27 a	12,07 a	40,43 a	3,72 a	0,11 a	0,09 a	4 a	123,7 a	39,3 a	117
BAG 07	101,89 a	12,22 b	52,35 a	4,25 a	0,12 a	0,08 b	3 a	111,1 a	39,1 a	147
BAG 53	91,54 a	13,25 a	34,95 b	3,03 a	0,14 a	0,08 b	4 a	103,7 a	27,9 b	163
BAG 54	97,21 a	12,56 a	27,07 b	2,69 a	0,13 a	0,10 a	1 b	114,3 a	25,8 b	169
BAG 33	90,39 a	11,62 a	31,38 b	3,01 a	0,13 a	0,10 a	4 a	101,4 a	27,2 b	179
BAG 01	109,04 a	12,93 a	31,74 b	3,05 a	0,12 a	0,10 a	2 b	106,0 a	20,7 b	187
BAG 61	98,07 a	10,71 a	29,21 b	2,33 b	0,11 a	0,08 b	2 b	122,0 a	35,6 b	187
BAG 51	94,47 a	11,04 a	28,37 b	2,75 a	0,12 a	0,10 a	2 b	104,5 a	32,9 b	188
BAG 37	103,95 a	11,48 a	27,45 b	2,71 a	0,11 a	0,10 a	3 a	109,1 a	21,0 b	190
BAG 62	83,68 a	10,83 a	25,75 b	2,22 b	0,13 a	0,09 b	3 b	123,5 a	26,2 b	192
BAG 11	92,14 a	10,76 a	27,80 b	2,95 a	0,12 a	0,11 a	1 b	100,3 a	36,6 b	206
BAG 02	105,04 a	12,77 a	31,31 b	2,61 a	0,12 a	0,08 b	3 a	96,5 a	33,7 b	207
BAG 64	81,26 a	8,97 b	22,89 c	2,16 b	0,11 a	0,10 a	3 a	123,9 a	28,1 b	208
BAG 67	86,81 a	8,45 b	30,63 b	1,79 b	0,11 a	0,07 b	3 b	117,4 a	43,8 a	218
BAG 03	91,22 a	7,44 b	23,97 c	2,31 b	0,08 a	0,09 a	3 a	108,7 b	45,9 a	223
BAG 39	61,99 b	8,06 b	19,15 c	1,94 b	0,13 a	0,10 a	5 a	111,3 a	28,4 b	223
BAG 69	65,59 b	8,24 b	20,09 c	2,13 b	0,13 a	0,11 a	2 b	111,3 a	37,0 b	225
BAG 18	77,53 b	10,04 a	20,97 c	2,12 b	0,13 a	0,10 a	3 a	105,5 a	24,7 b	231
BAG 45	87,72 a	9,97 a	21,55 c	1,64 b	0,12 a	0,07 b	4 a	110,3 a	30,3 b	235
BAG 26	86,30 a	10,07 a	26,10 b	2,47 a	0,12 a	0,09 a	3 b	102,5 a	22,9 b	241
BAG 44	76,32 b	8,86 b	20,62 c	1,72 b	0,12 a	0,09 b	1 b	113,2 a	59,7 a	244
BAG 35	82,53 a	9,58 a	24,08 c	2,25 b	0,11 a	0,09 a	3 a	102,2 a	28,8 b	250
BAG 60	65,14 b	7,75 b	15,65 c	1,70 b	0,12 a	0,11 a	3 a	105,8 a	39,2 a	252
BAG 21	61,34 b	8,52 b	19,29 c	2,07 b	0,14 a	0,11 a	4 a	94,4 b	33,5 b	253
BAG 29	88,02 a	9,70 a	25,53 b	2,16 b	0,11 a	0,08 b	3 a	99,2 a	37,0 b	259
BAG 50	57,26 b	6,75 b	20,50 c	1,73 b	0,12 a	0,08 b	4 a	108,1 a	39,5 a	259
BAG 20	80,33 a	8,21 b	20,57 c	2,13 b	0,10 a	0,10 a	4 b	99,3 a	32,9 b	261
BAG 57	73,76 b	7,92 b	21,68 c	2,34 b	0,11 a	0,11 a	1 b	101,7 a	36,9 b	269
BAG 59	73,22 b	9,33 a	16,73 c	1,55 b	0,13 a	0,09 a	2 b	107,4 a	32,4 b	275
BAG 28	90,28 a	9,94 a	27,18 b	2,23 b	0,11 a	0,08 b	4 a	92,4 b	17,7 b	278
BAG 49	62,52 b	8,12 b	22,26 c	1,75 b	0,13 a	0,07 b	4 a	87,1 b	51,2 a	289
BAG 66	45,05 b	5,34 b	18,47 c	1,77 b	0,12 a	0,09 a	4 a	97,0 b	40,4 a	297
BAG 17	86,33 a	8,20 b	20,23 c	1,83 b	0,08 a	0,11 a	4 a	81,7 b	26,8 b	307
BAG 65	66,32 b	6,52 b	20,41 c	2,06 b	0,10 a	0,10 a	2 b	95,6 b	51,3 a	307
BAG 23	46,79 b	5,14 b	9,86 c	1,07 b	0,11 a	0,11 a	4 a	89,7 b	50,9 a	310
BAG 32	70,39 b	7,22 b	17,95 c	1,33 b	0,10 a	0,08 b	1 b	123,7 a	34,7 b	314
BAG 52	54,85 b	6,22 b	18,68 c	1,52 b	0,11 a	0,08 b	4 a	94,7 b	50,7 a	316
BAG 75	73,85 b	8,00 b	24,42 c	2,15 b	0,11 a	0,09 b	4 a	75,2 b	28,1 b	316
BAG 12	70,15 b	7,29 b	17,25 c	1,78 b	0,10 a	0,10 a	1 b	97,0 b	47,6 a	322
BAG 09	40,58 b	4,49 b	17,43 c	1,58 b	0,11 a	0,09 b	3 a	84,7 b	52,8 a	337
BAG 05	65,05 b	7,59 a	26,73 c	2,07 b	0,12 a	0,08 b	1 b	67,1 a	30,0 b	358
BAG 10	53,22 b	5,64 b	15,51 c	0,99 b	0,11 a	0,07 b	3 b	99,5 a	24,0 b	383
BAG 25	52,27 b	5,20 b	14,65 c	0,83 b	0,10 a	0,06 b	2 b	98,2 a	45,5 a	383

Foi verificada variabilidade entre as características avaliada nos 44 clones. Baseado nestas características determinou-se o índice de seleção utilizado na discussão dos resultados.

O BAG 68 (Cameroon) foi o que apresentou o menor índice de seleção, demonstrando grande capacidade de adaptação a solos com elevadas concentrações de alumínio. Todos os demais clones apresentaram índice de seleção superior ao Cameroon, embora existam vários clones com valores de índice de seleção próximo.

O BAG 23 (Napier SEA), com índice de seleção de 310, foi posicionado em 36º lugar entre os 44 clones de capim-elefante, evidenciando menor tolerância à toxidez por alumínio.

Foram verificadas diferenças entre a produção de matéria seca da parte aérea (MSPA) e das raízes (MSR). Na parte aérea a variação foi de 4,49 g para o BAG 09 a 13,69 para o BAG 68 (Cameroon), sendo que a média de MSPA dos 44 clones foi de 9,06 g. A matéria seca de raízes variou de 0,83 no BAG25 a 4,25 no BAG 07, sendo a média de MSR de 2,18 g.

Trabalhos de pesquisa têm demonstrado que o crescimento do sistema radicular é a característica mais afetada tanto na susceptibilidade quanto na tolerância a fatores de acidez do solo (HOWELER & CAVADID, 1976), fato este comprovado no experimento. Resultados contrários foram obtidos por Martins et al. (2006) trabalhando com 32 genótipos de capim-elefante. Os autores concluíram que o peso seco de raízes e o incremento no crescimento de raízes (crescimento líquido do sistema radicular), foram as características não influenciadas pela presença do alumínio em solução nutritiva.

Ao se avaliar o incremento na parte aérea (IPA) observa-se que a média foi de 102,92 cm, variando de 67,1 cm no BAG 05, a 123,9 cm no BAG 64. O valor médio de incremento de raiz foi de 35,51 cm, variando de 17,7 cm no BAG 28 a 59,7 no BAG 44.

Quanto ao incremento no número de perfilhos (INP) a média observada foi de 2,96 perfilhos por genótipos. O clone que apresentou o maior incremento no número de perfilhos foi o BAG 39, com 5 perfilhos, enquanto vários clones apresentaram um único perfilho.

Os resultados observados nesse trabalho evidenciam a possibilidade de identificação e seleção de genótipos de *Pennisetum purpureum* tolerantes/resistentes ao alumínio tóxico presente na solução do solo, com melhora adaptação aos solos ácidos, encontrados em abundância na paisagem brasileira.

### Conclusões

- Há variabilidade genética entre os 44 clones de *Pennisetum purpureum* para a tolerância ao alumínio em solução nutritiva;
- O BAG 68 (Cameroon), foi o que apresentou o menos índice de seleção, evidenciando grande capacidade de adaptação a solos com elevadas concentrações de alumínio;
- A produção de matéria seca da parte aérea, foi maior no BAG 68 (Cameroon), comparada aos demais clones.

### Literatura Citada

BEN, J. R.; MORELLI, M.; ESTEFANEL, E. Influência da calagem na toxidez de alumínio para plantas de cevada. **Revista do Centro de Ciências Rurais**, Campinas, v. 6, n. 2, p. 177-189, 1976.

CANTARINO, M. A.; MARTINS, C. E.; ROCHA, W. S. D. da; SOUZA SOBRINHO, F. de S.; GOMES, F. T.; BRIGHENTI, A. M.; SILVA, R. O.; MONAIA L. de S. Resposta da *Brachiaria ruziziensis* ao alumínio tóxico presente em solução nutritiva. In: Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite. VIII. 2011. **Anais...** Juiz de Fora/MG. Embrapa Gado de Leite, 2011. 4p. CDROM.

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase in intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 1975, v. 23, p. 458-460.

CODOGNOTTO, L. M.; SANTOS, D. M. M.; LEITE, I. C.; MARIN, A.; MADALENO, L. L.; KOBORI, N. N.; BANZATTO, D. A. Efeito do alumínio nos teores de clorofilas de plântulas de feijão-mungo e labe-labe. **Revista Ecosistema**, Espírito Santo do Pinhal, v. 27, n. 2, p. 27-39, 2002.

FARIAS. **Índice de seleção em cultivares de algodoeiro herbáceo**. Universidade federal de Lavras. Lavras, MG. 2005. 122p. Tese de Doutorado.

FOY, C. D. Effects of aluminum on plant growth, In: CARSON, E. W. Ed. The plant root and its environment. **Charlottesville, University Press of Virginia**, 1974, p. 601-642.

HOWELER, R.H.; CAVADID, L.F. Screening of rice cultivars for tolerance to Al-toxicity in nutrients solutions as compared with a field screening method. **Agronomy Journal**. V. 68, 551-555. 1976.

MARTINS, C.E.; GOMES, F.T.; CÓSER, A.C.; MACHADO, V.S.; FERNANDES, N.R.A.; ALVES, F.C.T.; FREITAS, A.T. Avaliação de genótipos de capim-elefante quanto à tolerância ao alumínio. In: REUNIÓN DE LA ASSOCIACION LATINOAMERICANA DE PRODUCCIÓN ANIMAL. 19. REUNIÓN DE LA ASSOCIACION DE PRODUCCIÓN ANIMAL. 33. CONGRESSO DE DOBLE PROPÓSITO, 4... 2005. **Anais**. Tampico- México, 2005. p 345-348.

MARTINS, C. E.; SOUZA SOBRINHO, F.; GOMES, F. T.; CÓSER, A. C.; DERESZ, F.; ALVES, D. B.; ALMEIDA, M.; MORAES, L. E.; ALVES, F. C. T. Tolerância de genótipos de capim-elefante ao alumínio em solução. In: CONGRESSO PANAMERICANO DO LEITE. 9. 2006, **Anais**. Juiz de Fora. Embrapa Gado de Leite, 2006. p. 99-102.

MATTIELLO, E.M.; PEREIRA, M.G.; ZONTA, E.; MAURI, J.; MATTIELLO, J.D.; MEIRELES, P.G.; SILVA, I.R. Produção de matéria seca, crescimento radicular e absorção de cálcio, fósforo e alumínio por *Coffea canephora* e *Coffea arabica* sob influência da atividade do alumínio em solução. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, 2008, 32,1/6: 425-434.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n.1, p.17-25, 2007.

COTT, A. J. & KNOTT, M. A. A. Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. *Biometrics*, 30: 507-512, 1974.

WENZL, P.; MANCILLA, L.I.; MAYER, J.E.; ALBERT, R. & RAO, I.M. Simulating acid soils with nutrient solutions: The effects on *Brachiaria* species. *Soil Science Society of American Journal*, v.67, n.3, p.1457-1469, 2003.

# Isolamento de fungos anaeróbios do rúmen com potencial para aplicação biotecnológica

## Isolation of anaerobic rumen fungi with potencial for biotechnological application

Caputo, L.S.<sup>1</sup>; Valente M.S.B.<sup>1</sup>; Fernandes L.E.<sup>2</sup>; Silva R.C.B.<sup>3</sup>; Carneiro, J.C.<sup>4</sup>; Otenio, M.H.<sup>4</sup>; Ribeiro M.T.<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Acadêmicas do curso de Farmácia da Faculdade de Ciências Médicas e da Saúde de Juiz de Fora - Suprema

<sup>2</sup>Acadêmica do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora- CES

<sup>3</sup>Mestranda em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** Fungos anaeróbios do rúmen possuem capacidade de digerir polímeros da parede celular vegetal por penetrarem profundamente nos tecidos por meio de talos e rizóides de zoósporos móveis. Os gêneros mais comumente descritos pela literatura são: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces*. O objetivo deste trabalho foi identificar, com base em caracteres morfológicos, os fungos encontrados no rúmen de vacas Holandês X Gir. O líquido ruminal foi coletado de três vacas, acondicionado em garrafas térmicas pré-aquecidas a 39 °C e transportado para o laboratório. Após ajustar o pH do líquido ruminal, sob fluxo de CO<sub>2</sub>, alíquotas de 1,0 mL foram inoculadas em meio de diluição. Posteriormente 0,3 mL do material inoculado foi transferido para tubos contendo meio para fungo com antibiótico, os quais foram incubados a 39 °C. Após o crescimento das colônias preparou-se lâminas com fragmentos do fungo, pescados com pipetas de 1 mL e corados com o azul de algodão, estas foram analisadas em microscópio óptico no aumento de 100 vezes. O estudo das características dos micro-organismos ruminais serve como ferramenta para bioprospecção de biótipos importantes para diversas áreas do conhecimento. Foram encontrados no conteúdo ruminal analisado fungos celulolíticos anaeróbios dos gêneros *Neocallimastix*, *Anaeromyces* e *Aspergillus* spp tais fungos, de atividade celulolítica, lançam uma gama de enzimas celulares para degradar as paredes lignificadas das forrageiras.

**Palavras-chave:** fibra vegetal, fungos anaeróbios, morfologia microbiana.

**Abstract:** Anaerobic rumen fungi are capable of digesting plant cell wall polymers to penetrate deep into the tissues through rhizoid and stalks of mobile zoospores. The genera most commonly described in the literature are: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* and *Cyllamyces*. The objective of this study was to identify, based on morphological characters, the fungi found in the rumen of Holstein x Gir cows. The rumen fluid was collected from three cows, packed in thermos pre-heated to 39 °C and transported to the laboratory. After adjusting the pH of the rumen fluid under a flow of CO<sub>2</sub>, 1.0 mL aliquots were inoculated in a dilution. Subsequently 0.3 mL of the inoculated material was transferred to tubes containing medium fungal antibiotic, which were incubated at 39 °C. After growth of the colonies was prepared with fragments of the blades fungus, fish pipetting 1 mL and stained with blue cotton, they were examined under an optical microscope at 100-fold increase. The study of the characteristics of rumen microorganisms serves as a tool for bioprospecting biotypes important in many areas of knowledge. Were found in the rumen cellulolytic anaerobic fungi examined the genera *Neocallimastix*, *Anaeromyces* and *Aspergillus* spp., the cellulolytic activity of these fungi, launch a range of enzymes to degrade cell walls of lignified forages.

**Keywords:** plant fiber, anaerobic fungi, microbial morphology

## Introdução

Os anaeróbios são um grupo incomum de fungos zoospóricos capazes de digerir polímeros resistentes da parede celular de plantas por penetrarem profundamente nos tecidos

vegetais, normalmente não acessíveis às bactérias, por meio de talos e rizóides de zoósporos móveis, os quais aderem aos fragmentos das forragens. Estes microorganismos possuem enzimas altamente ativas na degradação da lignocelulose, sendo considerados, portanto, de grande importância nos estudos microbiológicos do ecossistema ruminal, por degradarem fibras em forragens de baixa qualidade (SRIDHARET al., 2007; BERCHILLI et al., 2011).

Os gêneros de fungos anaeróbios do rúmen mais comumente descritos pela literatura são: *Neocallimastix*, *Piromyces*, *Orpinomyces*, *Anaeromyces*, *Caecomyces* e *Cyllamyces*. Tais gêneros são pertencentes à família *Neocallimasticaceae*, dentro da ordem *Neocallimastigales* do filo *Neocallimastigomycota* (CHEN et al., 2007; LIGGENSTOFFER et al., 2010).

As espécies catalogadas são definidas pela análise da morfologia do talo (monocêntrico, policêntrico e filamentosos/bulboso) e pelo número de flagelos por zoósporo (uniflagelados ou poliflagelados). Dados moleculares têm sido usados como alternativa complementar na classificação dos fungos. A habilidade em degradar a parede celular vegetal varia de acordo com a espécie e a cepa dos fungos. Cepas do gênero *Caecomyces* normalmente demonstram atividade celulolítica reduzida se comparados à de cepas de outros gêneros (ALMEIDA, 2009). Os fungos anaeróbios participam da hidrólise da biomassa das plantas em ruminantes, por intermédio de enzimas, que têm importante função na fermentação ruminal. A hidrólise enzimática da celulose é considerada como um dos principais passos limitantes da produção biológica de biocombustíveis a partir de biomassa lignocelulósica (MAKI et al., 2009). Este trabalho teve por objetivo, identificar, com base em caracteres morfológicos, os fungos encontrados no rúmen de vacas Holandês X Gir.

## Material e Métodos

O líquido ruminal foi coletado de três vacas Holandês X Gir, fistuladas, no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite-Coronel Pacheco, MG, em garrafas térmicas preaquecidas a 39 °C e transportado para o Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG. O conteúdo das garrafas térmicas teve o pH ajustado para 6,8 e, uma alíquota de 1 mL foi transferida para um tubo estéril de *Hungate*, contendo 9 mL do meio de diluição (75,0 mL de solução mineral I, 75,0 mL de solução mineral II, 850,0 mL de água destilada, 1,0 mL de resazurina, para o preparo de 1,0 L). A solução mineral I era composta por: 6,0 g  $K_2HPO_4$  6% e água destilada qsp. Já solução mineral II continha: 6,0 g  $KH_2PO_4$ , 12,0 g  $(NH_4)_2SO_4$ , 12,0 g NaCl, 1,2 g  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , 1,2 g  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ , água destilada qsp.

Uma alíquota de 0,3 mL do líquido ruminal, anteriormente diluído na concentração de  $10^{-1}$ , foi inoculada em duplicata em meio para fungos (670,0 mL de água destilada, 150,0 mL de líquido ruminal centrifugado, 85,0 mL de solução mineral I, 85,0 mL de solução mineral II, 0,75 mL de solução de vitaminas, 2,0 g de celobiose, 0,5 g de extrato de levedura, 2,0 mL de hemina 0,1%, 1,0 mL resazurina 0,1%, 1,0 g de triptona, 1,0 g de ágar puro, 5,0 g de  $NaHCO_3$ , 0,8 g de Cisteína HCl, para o preparo de 1 L) acrescido de 1 mL de antibiótico e um fragmento de 4,0 cm x 4,0 cm de papel de celulose. Um litro de antibiótico continha: 300 mg de cloranfenicol, 250 mg de sulfato de estreptomicina, 40 mg de ampicilina, 125 mg de tetraciclina, 300 mg de sulfato de neomicina e 980 mL de água destilada. Todos os cuidados para a manutenção do ambiente em anaerobiose foram tomados, mantendo o fluxo de  $CO_2$  nos tubos.

Os tubos foram incubados em uma estufa regulada à 39 °C por período, de no mínimo, sete dias para o crescimento dos fungos. Ao observar o crescimento com a degradação do papel de celulose, uma alíquota foi transferida para manutenção e purificação da cultura em meio de *Roll-Tube* adicionado de ágar e antibiótico. Os isolados foram novamente repicados em meio de cultura para fungos contendo papel de celulose e antibiótico e, imediatamente, caracterizados em lâminas preparadas com fragmentos da estrutura fúngica obtidos por pescagem e corados com azul de algodão. As lâminas foram analisadas em microscopia óptica, em aumento de 100 vezes, sob condensador alto, nesta etapa, os fungos foram caracterizados por comparação com a literatura.



## Resultados e discussão

Os fungos isolados apresentaram-se conforme as figuras 1,2 e 3.

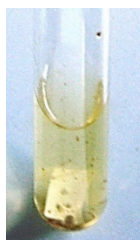


Figura 1

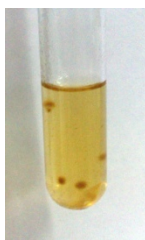


Figura 2



Figura 3

**Fonte:** Laboratório de Microbiologia do Rumen- Crescimento fúngico e degradação da celulose.

Dentre os micro-organismos isolados do conteúdo ruminal 42% apresentaram-se como celulolíticos, ou seja, foram capazes de degradar o papel de celulose. As figuras acima ilustram a degradação parcial (Figura 1 e 2) e total (Figura 3) da celulose.

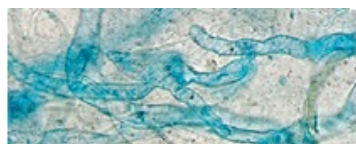


Figura 4



Figura 5

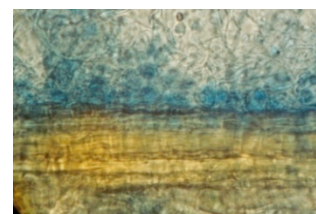


Figura 6

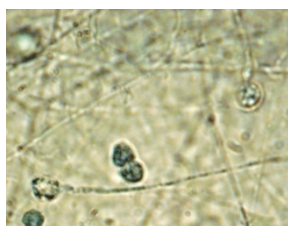


Figura 7

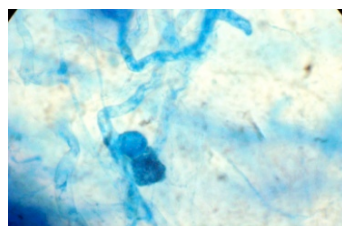


Figura 8

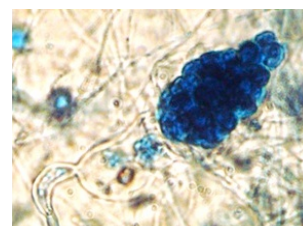


Figura 9

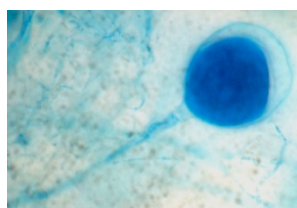


Figura 10

**Fonte:** Laboratório de Microbiologia do Rúmen Embrapa- Gado de Leite, lâminas obtidas através de isolado fúngico.

Tendo como base o estudo de Almeida, 2009, foi possível observar estruturas fúngicas do gênero *Neocallimastix* (Figura 4). A figura 5 ilustra um saco esporangial característico do gênero anteriormente citado, observada por Sridhar et al., 2007. Multiesporângios fixados em fragmentos de celulose (Figura 6), zoósporos uniflagelados (Figura 7) e talo maduro com esporângios (Figura 8) assemelham-se com as estruturas citadas por Chen, et al., 2007. Zoosporângios e zoósporos, com forma morfológica condizente ao gênero *Anaeromyces* podem ser visualizados na figura 9, cuja análise teve por base a publicação de Breton, 1990. A espécie *Aspergillus* sp., estudada por Almeida, 2009 foi observada na (Figura 10).

Estudos que busquem caracterizar, e entender o funcionamento dos fungos celulolíticos do rúmen são importantes tanto para adaptações e melhorias na alimentação dos ruminantes como para bioprospecção de potenciais produtores de celulase, com foco na produção de biocombustíveis.

Os fungos anaeróbios, presentes no rúmen auxiliam na digestão de componentes celulósicos da dieta. Uma vez estudados, torna-se possível buscar, através da manipulação dos fungos em laboratório, alterações de suas populações no rúmen, através da melhoria da forragem, e assim, obter aumento de peso corporal do animal, que degradará maior quantidade de fibras, garantindo ganhos na produção de leite e carne. Outra abordagem, é a utilização deste conhecimento para produção de etanol de segunda geração, através da utilização da biomassa lignocelulósica originada a partir da degradação da fibra vegetal.

## Conclusão

Foram observadas no conteúdo ruminal de vacas Holandês x Gir, fungos anaeróbios celulolíticos dos gêneros *Neocallimastix*, *Anaeromyces* e *Aspergillus* spp. Torna-se necessária, ainda, a adoção de outras metodologias de análise como a abordagem molecular filogenética e a adoção de testes enzimáticos para enriquecimento dos dados obtidos.

## Agradecimentos

A Fapemig

À Embrapa Gado de Leite e à toda equipe do Laboratório de Microbiologia do Rúmen pela cooperação e assistência que culminaram na realização deste trabalho.

## Literatura Citada

ALMEIDA, P. N. M. **População microbiana ruminal e atividade celulolítica de fungos provenientes de bovinos leiteiros alimentados com diferentes forragens**. 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, MG.

ARCURI, P. B.; LOPES, F. C. F.; CARNEIRO, J. da C. Microbiologia do rúmen. In: BERCHIELLI, T. T.; PIRES, A. V.; OLIVEIRA, S. G. de. **Nutrição de Ruminantes**. 2. ed. Jaboticabal: Funep, 2011. p. 115-60.

BRETON, A. et al. *Anaeromyces mucronatus* nov. gen., nov. sp. A new strictly anaerobic rumen fungus with polycentric thallus. **FEMS Microbiology**, v. 70, p. 177-82, 1990.

CHEN, Y. et al. *Caecomyces sympodialis* sp. nov., a new rumen fungus isolated from *Bov indicus*. **The Mycological Society of America**, Lawrence, v. 99, p. 125-130, 2007.

LIGGENSTOFFER, A. S. et al. Phylogenetic diversity and community structure of anaerobic gut fungi (phylum Neocallimastigomycota) in ruminant and non-ruminant herbivores. **The ISME Journal**, Stillwater, v. 4, p. 1225-35, 2010.

MAKI, M.; LEUNG, K. T.; QIN, W. The prospects of cellulase-producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. **International Journal of Biological Sciences**, v. 5, p. 500-16, 2009.

SRIDHAR, M. et al. Occurrence and prevalence of *Cyllumyces* genus: a putative anaerobic gut fungus in Indian cattle and buffaloes. **Current science**, v. 92, n. 10, p. 1356-1358, 2007.

## Estabilidade aeróbica de silagem de soja com diferentes concentrações de glicerina

Ana Luíza de Moura Carmo<sup>1</sup>, Camila Branda dos Reis<sup>1</sup>, Renata da Costa Barros Silva<sup>2</sup>, Lorena Evangelista Fernandes<sup>1</sup>, Junior César Fernandes<sup>3</sup>, Marlice Teixeira Ribeiro<sup>3</sup>, Marcelo Henrique Otenio<sup>3</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduandas do Curso de Ciências Biológicas (CES-JF) e Estagiárias de Iniciação Científica na Embrapa Gado de Leite

<sup>2</sup>Mestranda em Genética e Biotecnologia (UFJF) e bolsista Capes, Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** A silagem é uma forma de conservação de forragens que são utilizadas na alimentação de bovinos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a estabilidade aeróbica da silagem de soja adicionada de 0, 5, 10 e 15% de glicerina. A ensilagem foi preparada em tubos de PVC que continham em uma de suas tampas uma válvula para a saída de gases. Os silos foram abertos após 120 dias e aproximadamente 1,0 kg de silagem foi separada de cada um e armazenada em baldes plásticos. As temperaturas de cada silagem foram aferidas às 8:00 e 17:00 horas, por 9 dias. As silagens confeccionadas com diferentes concentrações de glicerina se mantiveram estáveis durante as primeiras 48 horas.

**Palavras-chave:** estabilidade aeróbica, glicerina, silagem, soja.

**Abstract:** Silage is a form of forage conservation that is utilized in the feeding of bovines. The objective of this paper was to evaluate the aerobic stability of soy silage with 0, 5, 10 and 15% of added glycerin. The ensilage was prepared in PVC tubes which contained a valve for gas escaping on one of the lids. The siles were open after 120 days and approximately 1,0kg of silage was separated from each one and stored in plastic buckets. The temperatures of each silage were measured at 8:00 and 17:00 hours for 9 days. The silages made with different concentrations of glycerin were remained stable during the first 48 hours.

**Keywords:** stability aerobic, glycerin, silage, soy.

### INTRODUÇÃO

No período de escassez de alimentos de rebanhos de bovinos uma via de provisão de forragem de alta qualidade é a conservação desta na forma de silagem e a soja é uma forrageira de excelente potencial para esse processo devido suas características nutricionais, a elevada produção de matéria seca e facilidade de colheita mecânica (PEREIRA et al, 2008).

De acordo com Jobim et al. (2007) a resistência da silagem a deterioração após a abertura do silo corresponde a estabilidade aeróbica da silagem. A presença de oxigênio na silagem induz a multiplicação de microorganismos aeróbios que consomem os compostos energéticos presentes elevando as perdas de matéria seca e do valor nutritivo, repercutindo negativamente sobre o desempenho produtivo dos animais (BERNARDES et al., 2007).

A intensidade de reações estabelecidas por fungos filamentosos, leveduras e bactérias aeróbias promove o aumento da temperatura da silagem após a abertura do silo (BERNARDES et al., 2007). De acordo com Driehuis et al. (2001) a estabilidade aeróbica é o tempo observado após a abertura do silo para que a silagem apresente elevação de 1 °C em relação à temperatura ambiente.

A produção de silagem é dependente da fermentação anaeróbia que envolve várias espécies de bactérias, sendo as bactérias produtoras de ácido lático uma delas, que contribuem para a preservação da silagem (SAVARIS et al., 2007). Estes autores relatam que o acúmulo de lactato gerado por essas bactérias reduz o pH da silagem, o que inibe a atividade microbiana indesejável. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a estabilidade aeróbica da silagem de soja confeccionada com diferentes concentrações de glicerina.

## Material e Métodos

A silagem de soja confeccionada com diferentes concentrações de glicerina, 0, 5, 10 e 15%, foi preparada no Campo Experimental de Santa Mônica, pertencente a Embrapa Gado de Leite. Foram utilizados 16 silos experimentais confeccionados em tubos de PVC com 10 cm de diâmetro, 50 cm de comprimento e tampas de borrachas, com uma delas contendo uma válvula para a saída de gases.

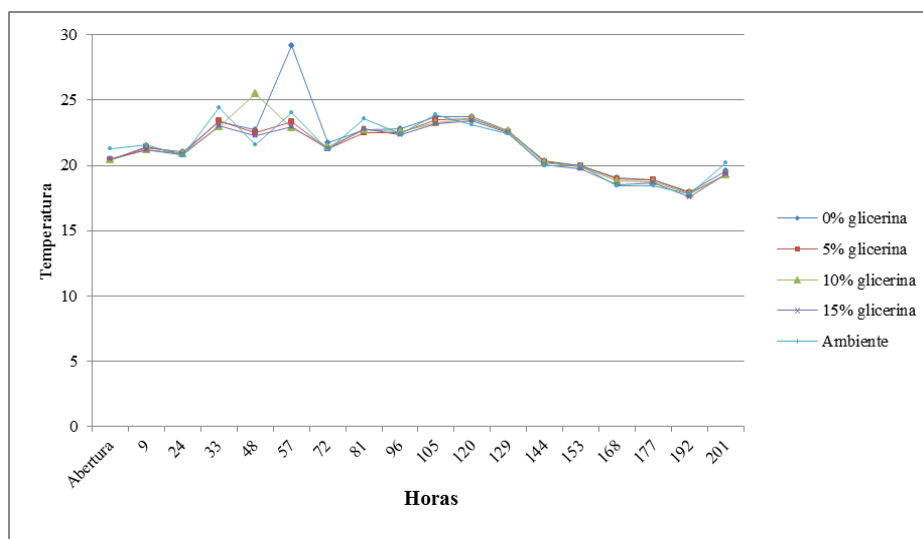
A cultivar de soja utilizada foi a Juliana, e a mesma foi ensilada no estágio fisiológico R7. A densidade de massa da ensilagem foi de 600 Kg/m<sup>3</sup>. As silagens ficaram acondicionadas nos silos durante 120 dias, em seguida os silos foram abertos e de cada um foi retirado aproximadamente 1,0 Kg de silagem, que foram armazenados em baldes plásticos, cobertos por uma camada de gaze e mantidos em uma sala com temperatura ambiente.

As temperaturas das silagens contidas nos baldes e do ambiente foram mensuradas através de termômetro de mercúrio inserido no centro da massa de silagem em intervalos de 9 e 15 horas durante 9 dias (216 horas). A metodologia utilizada para determinar a estabilidade aeróbica foi a de Driehuis (2001).

## Resultados e Discussão

Não houve diferença entre a temperatura ambiente e as temperaturas mensuradas das silagens contidas nos baldes durante as primeiras 48 horas, demonstrando que todas se mantiveram estáveis neste período. Após as 48 horas 100% da silagem excedeu 1 °C em relação à temperatura ambiente, o que caracteriza a perda da estabilidade aeróbica, como pode ser observado na Figura 1, condizendo com a metodologia de Driehuis (2001).

Savaris et al. (2007) relatam que o aumento do crescimento de fungos e bactérias indesejáveis causam a perda na estabilidade aeróbica, reduzindo o valor nutricional da silagem e segundo Siqueira et. al. (2007), os fungos (leveduras e mofos) são os microrganismos que mais provocam elevação da temperatura da silagem no período pós-abertura.



**Figura 1.** Temperatura das silagens de soja confeccionadas com diferentes concentrações de glicerina.

## Conclusões

As silagens de soja confeccionadas com diferentes concentrações de glicerina (0, 5, 10 e 15%) se mantiveram estáveis por 48 horas.

## Agradecimentos

A Fapemig.

A Embrapa Gado de Leite por possibilitar o meu enriquecimento acadêmico e a equipe do laboratório de microbiologia do rúmen.

### **Literatura Citada**

BERNARDES, T.F.; REIS, R.A.; SIQUEIRA, G.R. et al. Estabilidade aeróbia da ração total e de silagens de capim-Marandu tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.4, p. 754-762, 2007.

DRIEHUIS, F. ; OUDE ELFERINK, W. H.; VAN WIKSELAAR, P. G. Fermentation characteristics and aerobic stability of grass silage inoculants with *Lactobacillus buchneri*, with or without mofermentative lactic acid bacteria. **Grass and Forage Science**, v.56, p. 330-343, 2001.

JOBIM, C.C.; NUSSIO, L.G.; REIS, R.A.; SCHMIDT, P. Avanços metodológicos na avaliação da qualidade da forragem conservada. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.101-119, 2007.

PEREIRA, O.G.; OLIVEIRA, A.S.; Ribeiro, K.G.; RIGUEIRA, J.P.S.; FILHO, O.L.M.; SOUZA, W.F. **Otimização de dietas à base de silagens de soja**. VI Simpósio Internacional de Produção de Gado de corte, p.213-243, 2008.

SAVARIS, V.D.L; POZZA, P.C.; NUNES, R.V.; POZZA, M.S.S.; ÖELKE, C.A.; CARNEIRO, A.P.S. Perfil microbiológico e valores energéticos do milho e silagens de grãos úmidos de milho com adição de inoculantes para suínos. **Animal Sciences**, Maringá, v.29, n.4, p.403-409, 2007.

SIQUEIRA, G.R.; REIS, R.A.; SCHOCKEN-ITURRINO, R.P.; PIRES, A.J.V.; BERNARDES, T.F.; Amaral, R.C. Perdas de silagens de cana-de-açúcar tratadas com aditivos químicos e bacterianos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, p.2000-2009, 2007.

# Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite



X Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

## Trabalhos:

### **1. Eficiência da seleção visual em *Cynodon nlemfuensis* para produção de forragem**

Autores: Karoliny Nagib de Sales, Anna Carolina Pereira Staico, Fabiana Camarinha, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto Souza Sobrinho, Francisco José da Silva Lédo, Juarez Campolina Machado

### **2. Seleção indireta para produção de forragem em *Cynodon nlemfuensis***

Autores: Fabiana Camarinha, Anna Carolina Pereira Staico, Karoliny Nagib de Sales, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto Souza Sobrinho, Francisco José da Silva Lédo, Juarez Campolina Machado

### **3. Desempenho Financeiro de Propriedades Leiteiras**

Autores: Paula Bottoni de Araújo, Bruna Gontijo, Tammy Senra Fernandes Genú, Paulo do Carmo Martins, Alziro Vasconcelos Carneiro

### **4. Representação de resultados das avaliações de classificação linear para características de tipo com o uso do software R**

Autores: Leonardo Carvalho Nápolis Costa, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva, Rui da Silva Verneque, Wagner Arbex

### **5. Avaliação das frequências genotípica e alélica de DUMPS em touros da raça Girolando**

Autores: Isabela Gomes Barreto da Motta, Willian de Pascoa Pereira, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Isabela Fonseca, Wagner Antônio Arbex, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva, Marta Fonseca Martins

### **6. Estabilidade genômica em uma população hexaploide híbrida (capim-elefante X milheto)**

Autores: Tatiana Aparecida Silva, Marco Antônio Machado, Juliane Dornellas Nunes, Ana Luisa Sousa Azevedo, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Lédo, Emanuel Masiero da Fonseca e Antônio Vander Pereira

### **7. Caracterização fenotípica de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de mastite bovina**

Autores: Carla Christine Lange, Maria Aparecida V. P. Brito, Fabiana Santos da Silva, Mariana Caroline T. Alvim

#### **8. Poder de mercado das indústrias de laticínios no Brasil**

Autores: Marielli Cristina de Pinho, Marcos Cicarini Hott, Eduardo da Silva Mercês, Kennya Beatriz Siqueira

#### **9. Estudo da competitividade do setor lácteo brasileiro**

Autores: Eduardo da Silva Mercês, Kennya Beatriz Siqueira, Marielli Cristina de Pinho

#### **10. Viabilidade econômica da inserção de glicerina bruta na silagem de milho**

Autores: Vítor Lopes de Assis, Jackson Silva e Oliveira, Lorildo Aldo Stock, Fernando C. Ferraz Lopes

#### **11. Seleção de progênes de *Brachiaria ruziziensis* para qualidade de forragem**

Autores: Anna Carolina Pereira Staico, Karoliny Naqib de Sales, Fabiana Camarinha, Flávio Rodriqo Gandolfi Benites, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Lédo, Fausto Souza Sobrinho

#### **12. Impacto do aumento da concentração de dióxido de carbono(CO<sub>2</sub>) na duração e sobrevivência ninfal de *Mahanarva spectabilis* (DISTANT, 1909) (Hemiptera: Cercopidae)**

Autores: Ítalo Salvatore de Castro Pecci Maddalena, Alexander Machado Auad, Marcy das Graças Fonseca, Tiago Teixeira de Resende, Thiago Henrique Fazza dos Santos, Tamires Moreira Vieira

#### **13. Uso de vetores lentivirais para a produção de embriões transgênicos bovinos**

Autores: Fernanda Bernardes Eugênio de Paula, Eliza Diniz de Souza, Rafael José Otero Arroyo, Thamiris Dornelas de Araújo, Gabriela Nardy Quinelato, Lilian Tamy Iguma, Luiz Sergio de Almeida Camargo

#### **14. Avaliação da produção e composição do leite em vacas de primeira lactação da raça Guzerá**

Autores: Taísa Nascimento de Souza, Maria Gabriela C.D. Peixoto, Rui da Silva Verneque

#### **15. Massa de forragem e características estruturais do pasto de capim-Marandu submetido a período de descanso ou fixo ou variável**

Autores: Vinícius Sacramento Pacheco, Carlos Augusto de Miranda Gomide, Albert José dos Anjos, Mirtom José da Frota Morenz, Domingos Sávio Campos Paciullo, Fermino Deresz

#### **16. Composição morfológica e acúmulo de forragem de *Brachiaria decumbens* em sistema silvipastoril ou monocultivo**

Autores: Diego Rafael Gonzaga, Bruno da Costa Domith, Priscila Beliqoli Fernandes, Domingos Sávio Campos Paciullo

#### **17. Cinética de fermentação de silagem de três híbridos de milho em diferentes idades de corte estimada pela técnica de produção de gases *in vitro***

Autores: Larissa Gomes dos Reis, Ellen de Almeida Moreira, Fernando Pimont Pôssas, Tainá Silvestre Moreira, Paula Pereira Ribeiro de Moura, Maysa Andrade, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos, Lucio Carlos Gonçalves, Jose Avelino dos Santos Rodrigues, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

#### **18. Efeito dos extratos de *Baccharis dracunculifolia*, *Aristolochia cymbifera* Mart. e *Piper aduncum* e, da alga *Lithothamnium sp.* na cinética de fermentação e produção de metano**

Autores: Larissa Gomes dos Reis, Ellen de Almeida Moreira, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, Ademar Alves da Silva Filho, Mirton José Frota Morenz, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos

**19. Cinética de fermentação in vitro de silagem de sorgo em diferentes idades de corte**

Autores: Larissa Gomes dos Reis, Tainá Silvestre, Thierry Ribeiro Tomich, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, Mariana Magalhães Campos, Fernanda Samarini Machado, José Avelino Santos Rodriques, Lúcio Carlos Gonçalves

**20. Cinética de fermentação de silagem de milho com adição de glicerina bruta**

Autores: Larissa Gomes dos Reis, Almira Biazon Franca, Tainá Silvestre, Ellen de Almeida Moreira, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, Mirton José Frota Morenz, Jackson Oliveira e Silva, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos

**21. Macrofauna do solo em sistema de integração lavoura-pecuária**

Autores: Renata do Amaral Rangel, Juliana Amorim Fonseca, Carlos Renato Tavares de Castro



# **Eficiência da seleção visual em *Cynodon nlemfuensis* para produção de forragem**

## **Efficiency of visual selection in *Cynodon nlemfuensis* for forage production**

Karoliny Nagib de Sales<sup>1</sup>, Anna Carolina Pereira Staico<sup>1</sup>, Fabiana Camarinha<sup>1</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>2</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de iniciação científica e estudante do curso de Ciências Biológicas no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES: karolsales\_\_@hotmail.com, carol\_staico@hotmail.com, fabycamarinha@hotmail.com.

<sup>2</sup>Pesquisador Melhoramento de Forrageiras da Embrapa Gado de Leite. Flavio.benites@embrapa.br, fausto.souza@embrapa.br, francisco.ledo@embrapa.br, juarez.machado@embrapa.br.

**Resumo:** Foram avaliadas 200 plantas com relação as notas de vigor dadas por quatro avaliadores, peso verde (PV) e peso seco (PS) da forragem. O experimento foi avaliado em blocos aumentados e o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da seleção visual correlacionada com o peso verde e peso seco de forragem de plantas de *Cynodon*. Foram realizadas correlações de Pearson entre as notas de vigor dos avaliadores entre si e entre o PS e PV da forragem. Houve elevada correlação entre as notas de vigor dos quatro avaliadores quando comparados entre si e também em relação às notas de vigor com o PS e PV e correlações elevadas entre PS e PV. Com as estimativas de correlações de Pearson elevada, conclui-se que a seleção visual baseada no vigor das plantas pode ser empregada para seleção indireta da produtividade de forragem em *C. nlemfuensis*, sendo eficiente no início do programa de melhoramento.

**Palavras-chave:** correlações, melhoramento de forrageiras, notas de vigor, peso verde, peso seco.

**Abstract:** Visual selection was performed in 200 plants of *C. nlemfuensis*, comprising scores given by four evaluators, in addition to fresh weight (PV) and dry weight (PS) determination. This study was conducted in augmented block design and the objective was to evaluate the efficiency of visual selection correlated with fresh weight and dry weight of the plants. Pearson correlations were performed between the scores of the different evaluators and between the scores, PV, and PS. High correlations were observed between the vigor scores of the four evaluators, between the scores, PV, and PS, and between PV and PS. High estimates of Pearson correlations lead to the conclusion that both the visual selection and the evaluation of the parameter PV in *C. nlemfuensis* are effective at the beginning of the breeding program.

**Keywords:** correlations, dry weight, forage breeding, fresh weight, plant vigor.

### **Introdução**

A avaliação visual no melhoramento de plantas é utilizada em programas onde a intenção é selecionar caracteres de alta herdabilidade, demonstrando eficiência para caracteres que são controlados por um ou poucos genes, onde a influência do ambiente na expressão do caráter não é acentuada. Normalmente para essas avaliações os avaliadores utilizam escalas de notas. Para caracteres quantitativos controlados por vários genes e com elevada influência do ambiente a avaliação visual, torna essa prática ineficiente.

Cutrim et al. (1997), avaliaram o potencial da seleção visual na produtividade de arroz irrigado. Foram utilizados 11 avaliadores com diferentes experiências na cultura. Cada avaliador selecionou 55 plantas visualmente mais produtivas em três populações diferentes. As plantas dessas populações foram pesadas e as 55 mais produtivas de cada população foram comparadas com as 55 plantas selecionadas por cada um dos

avaliadores. As médias de coincidência dos 11 avaliadores foram de 11.2%, 15.7% e 15% nas populações 1, 2 e 3 respectivamente.

Os autores concluíram que ficou evidente que o melhoramento visando o aumento da produtividade de grãos por meio da seleção visual é de baixa eficiência. Resultados semelhantes a esses têm sido constatados em outras culturas e estão disponíveis em Cutrim et al., (1997). Em princípio, o melhorista só deve utilizar a seleção visual no descarte dos indivíduos nitidamente inferiores ou para outros caracteres cuja herdabilidade seja maior.

Outro resultado encontrado pelos autores é que a experiência do avaliador com a cultura não tem influência no grau de coincidência da seleção visual como a produtividade de grãos de arroz, uma vez que o pior avaliador teve 3.7% de coincidência na seleção visual com a produtividade de grãos e o melhor teve 39.1% de coincidência.

Apesar dos estudos de seleção visual em forrageira serem escassos, Borges et al., (2011) trabalhando com *B. ruziziensis* encontraram valores expressivos de correlações entre notas de vigor das plantas com as características peso verde de forragem e peso seco de forragem, que são caracteres quantitativos.

Outra forrageira de importância para a alimentação de vacas de leite é a Gramma Estrela Roxa classificada como *C. nlemfuensis* var. *nlemfuensis*, e teria sido introduzida no Brasil a partir de mudas trazidas por fazendeiros de Porto Rico entre as décadas de 1960 e 1970, sem passar por um processo de validação por instituto de pesquisa. (ARONOVICH & ROCHA, 1985). Desta forma as informações sobre melhoramento dessa espécie são praticamente inexistentes nas condições brasileiras.

Desta forma o objetivo do trabalho foi avaliar a eficiência da seleção visual correlacionada com o peso verde e peso seco de forragem de plantas de *Cynodon nlemfuensis*.

## Material e Métodos

Foram avaliadas 200 plantas de *C. nlemfuensis* provenientes de sementes coletadas em pastagens de Gramma Estrela Roxa em delineamento de blocos aumentados com cinco testemunhas comuns em cada um dos 4 blocos. O experimento foi realizado no Campo Experimental de Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Valença – RJ.

Após a coleta das sementes procedeu-se o seu beneficiamento e plantio em bandejas plásticas contendo substrato comercial. As plântulas germinadas foram transplantadas para copos plásticos contendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco (1:1:1). Cerca de 30 dias depois foram plantadas no campo espaçadas de 2,5 metros tanto na linha como entre as linhas. Foi realizado um corte de uniformização das plantas 60 dias após o plantio e cerca de 35 dias depois procedeu-se o corte de avaliação do experimento. Foram mensuradas o seu vigor, por meio de uma escala de notas variando de 1 (baixo vigor) a 5 (elevado vigor), o peso verde (PV) e seco (PS) da forragem. Para a obtenção deste último, após o corte das plantas foram retiradas amostras da forragem e secadas em estufa com ventilação forçada a 55 °C por 72 h. As avaliações visuais foram realizadas por quatro avaliadores de forma independente e com diferentes experiências na cultura, utilizando-se a média para a realização das análises.

Foi realizada a análise de variância seguindo o modelo de blocos aumentados utilizando-se o programa Genes. Foi utilizada a correlação de Pearson para avaliar a eficiência dos quatro avaliadores, de cada avaliador com o PV e PS da forragem, a correlação da média da característica PV com a média ajustada da mesma característica e a correlação entre PV e PS. As análises de correlação de Pearson foram realizadas também no programa Genes.

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta os resultados das correlações encontradas entre os avaliadores e todas as características avaliadas.

A média das notas de vigor dos 4 avaliadores associadas com o PV da forragem de 200 plantas foi de 83%, evidenciando elevada correlação do vigor das plantas de *C.*

*nlemfuensis* com o PV da forragem. As correlações das notas de cada um dos avaliadores comparadas dois a dois e a correlação da média de cada avaliador com a média de vigor dos quatro avaliadores (AVm) foram bastante elevadas, o que evidencia que a experiência com a cultura não influencia na seleção visual das melhores plantas, resultado esse que concorda com Cutrim et al., (1997). As correlações das notas de vigor de cada avaliador com o PV de forragem variaram de 75,79% à 82,36% (Tabela 1). Borges et al., (2011) encontraram correlação de nota de vigor com PV de forragem de 52,73% em *B. ruziziensis*, menor que a encontrada em *C. nlemfuensis*, porém de magnitude considerada alta.

A correlação da média do PV da parcela com a média ajustada do PV foi de 99,56%, evidenciando que o ajustamento das médias não influenciou na seleção de plantas, podendo o delineamento de blocos aumentados ser bastante útil nas fases iniciais do programa de melhoramento de *C. nlemfuensis* (Tabela 1).

A correlação das médias do PV com as médias do PS das parcelas foi de 98,52%, mostrando que apenas o peso verde é suficiente para avaliação das plantas. Resultados semelhantes foram encontrados por Borges et al., (2011) em *B. ruziziensis*, que encontraram correlação entre PV e PS elevada (92,57%). Em função da boa associação do PV com as notas dos avaliadores correlacionaram altamente também com o PS da forragem (Tabela 1).

Cruz et al., (2004) comentam que a mensuração da forragem verde com posterior descarte do material, agiliza as avaliações diminuindo custo e possibilitando avaliação de maior número de genótipos, contribuindo com o aumento da eficiência do programa. Seguindo o raciocínio apresentado acima, poderia-se avaliar um número maior de progênies apenas utilizando as notas dos avaliadores para seleção de genótipos no início do programa. Esses resultados devem ser confirmados em mais cortes para que a seleção visual em *C. nlemfuensis* possa ser usada com critério científico.

**Tabela 1.** Correlações de Pearson entre as médias do vigor das plantas atribuídas pelos avaliadores 1, 2, 3 e 4 (AV1, AV2, AV3 e AV4 respectivamente), Peso Verde (PV), Peso Verde Ajustado (P.V Ajustado) e Peso Seco de forragem (P.S), média de vigor de 4 avaliadores (AVm) de plantas de *C. nlemfuensis*.

	AVm	AV2	AV3	AV4	PV	PS
AV1	92,78%	87%	81%	83%	77.65%	77.93%
AV2	95,57%		87%	87%	82.36%	81.61%
AV3	93,32%			83%	77.08%	75.07%
AV4	94,40%				75.79%	74.80%
P.V Ajustado	83%				99.56%	97.48%
P.V	83%					98.52%

## Conclusões

Existe forte associação entre o vigor das plantas de *C. nlemfuensis* com a produção de forragem.

A seleção visual baseada no vigor das plantas poderá ser empregada para seleção indireta da produtividade de forragem em *C. nlemfuensis*.

O peso verde de forragem tem elevada correlação com o peso seco.

A experiência dos avaliadores com a cultura não interfere na eficiência da seleção visual baseada no vigor das plantas.

## Agradecimentos

Ao CNPq

Ao chefe da estação experimental de Santa Mônica, seus técnicos e assistentes na condução do experimento.

### **Literatura citada**

ARONOVICH, S.; ROCHA, G.L. Gramíneas e leguminosas importância no Brasil central Pecuário. **Informe Agropecuário**, v.11, n.132, p.3-13, 1985.

BORGES, V., SOUZA SOBRINHO, F., LÉDO, F.J.S., KOPP, M. Associação de caracteres e análise trilha em progênies de meios-irmãos de *Brachiaria ruziziensis*. **Ver. Ceres**, Viçosa, v.58, n.6., p. 765-772, nov/dez, 2011.

CRUZ, C. D.; REGAZZI, A. J.; CARNEIRO, P. C. S. **Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético**. 3. ed. Viçosa: UFV, 2004. v. 1. 480 p.

CUTRIM, V.A.; RAMALHO, M.A.P., CARVALHO, A.M. Eficiência da seleção visual na produtividade de grãos de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 601-606, 1997.

# Seleção indireta para produção de forragem em *Cynodon nlemfuensis*

## Indirected selection for forage production in *Cynodon nlemfuensis*

Fabiana Camarinha<sup>1</sup>, Anna Carolina Pereira Staico<sup>1</sup>, Karoliny Nagib de Sales<sup>1</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>2</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de iniciação científica e estudante do curso de Ciências Biológicas no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES: fabycamarinha@hotmail.com, carol\_staico@hotmail.com, karolsales\_@hotmail.com

<sup>2</sup> Pesquisador Melhoramento de Forrageiras da Embrapa Gado de Leite. Flavio.benites@embrapa.br, fausto.souza@embrapa.br, francisco.ledo@embrapa.br, juarez.machado@embrapa.br.

**Resumo:** Foram avaliadas 200 plantas de *C. nlemfuensis* em blocos aumentados para as características peso verde (PV), peso seco (PS) de forragem e vigor das plantas que foram mensurados por notas de quatro avaliadores com o objetivo de avaliar o potencial produtivo de plantas de *Cynodon nlemfuensis* e verificar a eficiência da seleção visual. Foram selecionadas as 11 melhores e as 11 piores plantas com base nas características PV, PS e vigor de plantas. Os resultados mostram que a seleção visual é eficiente quando comparada com a coincidência das plantas selecionadas pelo PV e PS, considerando-se que a produção de forragem é um caráter quantitativo.

**Palavras-chave:** caracteres quantitativos, melhoramento de forrageiras, peso seco, peso verde, vigor de plantas.

**Abstract:** 200 plants *C. nlemfuensis* were evaluated in augmented block for characteristics fresh weight, dry weight forage and plant vigor scores were measured by four assessors with the objective to evaluate the productive potential of plants of *C. nlemfuensis* and verify the efficiency of visual selection. We selected the 11 best and 11 worst plants based on characteristics fresh weight, dry weight and vigor of plants. The results show that visual selection is effective when compared with the coincidence of the plants selected by the fresh weight and dry weight, considering that forage production is a quantitative character.

**Keywords:** dry weight, forage breeding, fresh weight, quantitative character, plant vigor.

## Introdução

Dentre as gramíneas existentes como alternativas para exploração à pasto, o gênero *Cynodon* (Gramas Estrelas e Bermudas) apresenta vantagens como a elevada produtividade, qualidade da forragem, capacidade de resposta a adubação, resistência ao pisoteio, boa adaptação a diferentes tipos de solos e clima, boa tolerância a solos úmidos e a baixas temperaturas (VILELA, 2005).

O potencial forrageiro do *Cynodon* foi avaliado em um Simpósio realizado em Juiz de Fora – MG (ALVIM et al., 1996) e uma das conclusões obtidas no simpósio foi que o melhoramento das espécies e híbridos de *Cynodon* nas condições ambientais brasileiras poderiam produzir nova linha de cultivares, com boas características de adaptação.

A seleção visual foi utilizada amplamente no início dos programas de melhoramento genético, principalmente na metodologia de seleção massal, para caracteres de alta herdabilidade. Sua utilização tem diminuído principalmente em culturas onde os caracteres de interesse são quantitativos e as correlações da seleção visual com a produção são baixas. Resultados semelhantes a esses têm sido constatados em outras culturas e estão disponíveis em Cutrim et al., (1997).

Já em forrageiras, onde os programas estão no início, e as espécies ainda não foram totalmente domesticadas os resultados da seleção visual tem apresentado eficiência. Borges et al., (2011) trabalhando com *B. ruziziensis* obtiveram alta correlação entre a seleção visual e o peso verde e peso seco da forragem.

O presente trabalho objetivou avaliar o potencial produtivo de plantas de *Cynodon nlemfuensis* e verificar a eficiência da utilizando da seleção visual.

## Material e Métodos

Foram avaliadas 200 plantas de *C. nlemfuensis* provenientes de sementes coletadas em pastagens de Gama Estrela Roxa em delineamento de blocos aumentados com cinco testemunhas comuns em cada um dos 4 blocos. O experimento foi realizado no Campo Experimental de Santa Mônica, da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Valença – RJ.

Após a coleta das sementes procedeu-se o seu beneficiamento e plantio em bandejas plásticas contendo substrato comercial. As plântulas germinadas foram transplantadas para copos plásticos contendo como substrato uma mistura de terra, areia e esterco (1:1:1). Cerca de 30 dias depois foram plantadas no campo espaçadas de 2,5 metros tanto na linha como entre as linhas. Foi realizado um corte de uniformização das plantas 60 dias após o plantio e cerca de 35 dias depois procedeu-se o corte de avaliação do experimento. Foram mensuradas o seu vigor, por meio de uma escala de notas variando de 1 (baixo vigor) a 5 (elevado vigor), o peso verde (PV) e seco (PS) da forragem. Para a obtenção deste último, após o corte das plantas foram retiradas amostras da forragem e secadas em estufa com ventilação forçada a 55 °C por 72 h. As avaliações visuais foram realizadas por quatro avaliadores de forma independente, utilizando-se a média para a realização das análises.

Foi realizada a análise de variância seguindo o modelo de blocos aumentados utilizando-se o programa Genes. As médias originais (não ajustadas) e as ajustadas de cada tratamento foram utilizadas para realização de análises de correlação entre as diferentes variáveis.

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta as médias das 11 melhores e das 11 piores plantas e a média geral para PV, PS e vigor. Quando compara-se as 11 melhores progênies selecionadas para PV com as 11 selecionadas para PS há 81.81% de coincidência nas plantas selecionadas. Esses resultados estão de acordo com os encontrados por Borges et al., (2011) que obtiveram correlação elevada de 92.57% entre PV e PS. Quando compara-se as 11 piores progênies selecionadas em relação ao PV e PS há 90.90% de coincidência entre as piores plantas, reforçando os resultados encontrados por Borges et al., (2011) (Tabela 1).

A coincidência das 11 melhores plantas selecionadas baseados na média das notas de vigor com PV e PS da forragem, foi obtidos valores de coincidência de 63.63% e 72.72%, respectivamente (Tabela 1). Esses valores são considerados elevados, pois a produção de forragem é um caráter controlado por vários genes. Cutrim et al. (1997), avaliando a seleção visual (notas dadas por 11 avaliadores) com a produção de grãos de arroz em três populações, encontraram correlação das plantas selecionadas visualmente com o peso de grãos de 11.2%, 15.7% e 15%, respectivamente para cada uma das três populações. A eficiência da seleção visual encontrada no presente trabalho são superiores aos valores encontrados por Cutrim et al (1997), indicando sua eficiência para o caráter quantitativo PV e PS em *C. nlemfuensis*.

Comparando-se a coincidência do PV e PS de forragem das 11 piores plantas com a média do vigor das plantas, houve 54.54% de coincidência para ambas as características (Tabela 1). Esses resultados podem evidenciar que a seleção visual foi mais eficiente para selecionar as melhores plantas do que para descartar as piores.

As médias das plantas selecionadas para PV e PS foram 45% e 42% respectivamente superiores a média das 200 plantas avaliadas (Tabela 1), evidenciando-se a existência de grande variabilidade entre as plantas e a possibilidade de obtenção de ganhos genéticos expressivos com a seleção.

Deve haver estudos mais aprofundados envolvendo mais cortes para confirmar os resultados deste trabalho, porém esses resultados evidenciam a possibilidade da utilização da seleção visual, o que permitiria avaliação de um maior número de genótipos e a utilização de menor mão de obra, uma vez que não haveria a necessidade de pesagem das plantas (RAMALHO et al., 2008).

Tabela 1- Médias das 11 melhores e as 11 piores plantas de *C. nlemfuensis* e média geral para as características produção de matéria verde (PV) e seca (PS) de forragem e vigor das plantas.

11 melhores progênies						11 piores progênies					
Plan.	PV(g)	Plan	PS(g)	Plan.	Vigor	Plan.	PV(g)	Plan.	PS(g)	Plan	Vigor
8	4260	8	1030	2	4.38	1	280	1	75.68	1	1.00
10	3760	12	1744	7	4.38	59	200	59	63.42	27	1.38
12	7120	98	1073	8	5.00	60	200	60	60.00	54	1.38
13	3800	119	1222	12	4.88	62	200	62	64.70	56	1.25
98	4500	127	1269	97	4.88	79	280	79	82.63	59	1.00
119	4400	129	994	119	4.88	93	220	93	60.85	60	1.00
127	4420	135	985	127	4.50	121	280	99	89.73	62	1.00
129	3980	146	1005	129	4.38	149	230	121	83.58	77	1.25
146	3900	150	973	135	4.63	173	320	149	66.06	99	1.25
166	3820	166	1019	166	4.75	199	170	199	43.20	121	1.25
184	4260	184	1030	184	4.38	200	320	200	87.84	173	1.00
M <sub>s</sub>	3696		1028		4.23		245		70.69		1.15
M	1656		432		2.84						

## Conclusões

Existe grande variabilidade genética para produção de forragem entre as plantas originadas de sementes de *C. nlemfuensis*.

A seleção visual em *C. nlemfuensis* para peso verde e peso seco da forragem que são caracteres quantitativos mostrou-se eficiente.

A seleção indireta para vigor de plantas é eficiente para identificar as plantas mais produtivas.

## Agradecimentos

Ao CNPq.

Ao gestor da estação experimental de Santa Mônica, seus técnicos e assistentes na condução do experimento.

## Literatura Citada

ALVIM, M.J.; BOTREL, M.A.; PASSOS, L.P.; BRESSAN, M.; VILELA, D. **Anais do workshop sobre o potencial forrageiro do gênero *Cynodon***. Juiz de Fora - MG, 1996, 181p.

BORGES, V., SOUZA SOBRINHO, F., LÉDO, F.J.S., KOPP, M. Associação de caracteres e análise trilha em progênies de meios-irmãos de *Brachiaria ruziziensis*. **Ver. Ceres**, Viçosa, v.58, n.6, p. 765-772, nov/dez, 2011.

CUTRIM, V.A.; RAMALHO, M.A.P., CARVALHO, A.M. Eficiência da seleção visual na produtividade de grãos de arroz (*Oryza sativa* L.) irrigado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 32, p. 601-606, 1997.

RAMALHO, M.A.P, SANTOS, J.B; PINTO, C.A.B.P. **Genética na agropecuária**. 4. ed. rev. Lavras: UFLA, 2008. 463 p

VILELA, D. Potencial das pastagens de *Cynodon* na pecuária de leite. In: VILELA, D.; RESENDE, J.C.; LIMA, J (Ed.). ***Cynodon***: Forrageiras que estão revolucionando a pecuária brasileira. 1. ed. Juiz de Fora: Ed. Embrapa Gado de Leite, Brasil, 2005, p.191-223.

.



# Desempenho Financeiro de Propriedades Leiteiras

## Financial Performance of Dairy Properties

Paula Bottoni de Araújo<sup>2</sup>, Bruna Gontijo<sup>2</sup>, Tammy Senra Fernandes Genú<sup>2</sup>, Paulo do Carmo Martins<sup>1</sup>, Alziro Vasconcelos Carneiro<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Gado de Leite; <sup>2</sup>Estagiários

**Resumo:** Aproximadamente 1,4 milhão das propriedades no Brasil se dedicam à atividade primária, gerando emprego e renda de modo descentralizado. Mesmo com mudanças onde as propriedades leiteiras buscaram internalizar tecnologias no processo produtivo, viu-se pouca transformação na implementação de tecnologias de gestão. Ainda é grande o número de propriedades que não promovem controles sobre situações que impactam o desempenho financeiro das propriedades. O produtor toma decisão sobre o futuro com base em informações do passado. Por isso o objetivo desse trabalho é avaliar os conceitos de gestão financeira e contábeis (EBTIDA, margem de EBTIDA, ROI, GIRO DO ATIVO, EVA e Pontos de Equilíbrio) em 21 propriedades leiteiras, visando obter indicadores que permitam analisar o desempenho mensal. Em média 23% das propriedades obtiveram EBTIDA negativo e 30% tiveram resultados consideráveis, porém em sua maioria encontra-se em dificuldade. A aplicação da metodologia visa melhoria na obtenção de práticas de manejo e gestão, para atender à demanda no setor.

**Palavras-chave:** análise financeira, propriedades leiteiras, sistema de produção.

**Abstract:** Approximately 1.4 million properties in Brazil are engaged in primary activity, generating jobs and income in a decentralized manner. Even with changes where dairy herds tried to internalize technologies in the production process, there was little change in the implementation of management technologies. There is a huge number of properties that do not promote controls on situations that impact the financial performance of properties. The producer makes the decision about the future based on past information. Therefore the aim of this study is to evaluate the concepts of financial management and accounting (EBTIDA, EBTIDA's margin, ROI, asset turnover, EVA e break even price) on 21 dairy farms in order to obtain indicators to analyze the monthly performance. On average 23% of properties have obtained negative EBITDA and 30% had significant results, but mostly of the properties are in trouble. The methodology aims to achieve improved management practices and management, to meet demand in the sector.

**Keywords:** dairy farms, financial analysis, production systems.

## Introdução

A atividade primária ocorre em aproximadamente 1,4 milhão de propriedades em todo o Brasil, de acordo com o Censo Agropecuário de 2006 (IBGE, 2012). O PIB da agropecuária brasileira encerrou 2011 com alta de 3,9%, crescendo mais que o PIB nacional que foi de 2,7% (IBGE, 2012). Como está presente em todo o território nacional, esta atividade possibilita a geração de emprego e renda de modo descentralizado, em praticamente todos os municípios brasileiros.

Apesar da transformação ocorrida nas últimas duas décadas, em que as propriedades leiteiras buscaram internalizar tecnologias no processo produtivo, pouco se avançou na adoção de tecnologias de gestão. Ainda é grande o número de propriedades que não promovem controles sistemáticos sobre os eventos que impactam o desempenho financeiro das propriedades. Por outro lado, as metodologias disponíveis para aferição de desempenho, nem sempre consideram indicadores zootécnicos e indicadores econômicos, numa análise em conjunto. Finalmente, há um vazio metodológico que tornam frágeis todas as análises atuais, pois o produtor que adota anotações sistematizadas toma decisões no presente considerando os fatos econômicos acumulados nos últimos doze

meses. Portanto, os fatos mais recentes e de maior impacto no presente são minimizados, o que induz o produtor a tomar decisões de modo pouco seguro. Na prática, o produtor toma decisão sobre o futuro com base em informações do passado, e não presente.

O presente trabalho objetivou testar a aplicação de conceitos de gestão financeira e contábeis em propriedades leiteiras, visando obter indicadores que permitam analisar o desempenho mensal, considerando indicadores econômicos e zootécnicos selecionados.

## **Material e Métodos**

Foram selecionadas 21 propriedades por meio de amostragem não representativa. Os produtores participantes da pesquisa têm mais de 70% da renda da propriedade auferida com leite e estão localizados nos estados de Minas Gerais e Goiás. A coleta de dados se deu entre os meses de julho e dezembro de 2011, através de um relatório próprio. Os seis entrevistadores passaram por 40 horas de treinamento teórico e prático. Para aferição do desempenho financeiro e contábil foram apurados os seguintes indicadores:

- EBTIDA (*Earning Before Interests, Taxes, Depreciation and Amortization*) – Caixa gerado na propriedade no mês. É uma medida aproximada de lucro, sem descontar a depreciação de máquinas e benfeitorias e os juros de financiamento;
- MARGEM DE EBTIDA – Percentual do caixa em relação à receita da sua propriedade no mês; ROI – Retorno financeiro obtido no mês com todos os investimentos que se tem na propriedade.
- GIRO DO ATIVO – Indica a eficiência no uso de ativos. Índice obtido pela divisão da receita da propriedade sobre o total de ativos;
- EVA (*Economic Value Added*) – É o valor perdido na produção de leite neste mês, depois que todos os fatores de produção foram remunerados, ou seja, o capital empatado com terra, máquina, e também o pagamento da mão-de-obra, empréstimos e de todos os fornecedores;
- PONTOS DE EQUILÍBRIO: a) FINANCEIRO– Volume de leite que permite cobrir todas as despesas da produção; b) OPERACIONAL – Volume de leite que permite cobrir todas as despesas da produção e da depreciação de ativos; c) ECONÔMICO – Volume de leite que permite cobrir todas as despesas da produção, da depreciação de ativos e remunera os fatores de produção.

Visando explicar os indicadores econômicos encontrados, também foram levantados indicadores zootécnicos, considerando: Estrutura do rebanho (percentuais de vaca em lactação em relação ao rebanho e vaca em lactação em relação ao total de vacas); Produção; Produtividade dos fatores (vaca, mão de obra e terra); Gastos com mão de obra em relação à receita e; Perda com morte de animais.

Como complementos das informações levantadas, são considerados bonificações de qualidade, representadas por Contagem bacteriana total - CBT, Contagem de células somáticas - CCS, Matéria Gorda e Proteína. Os resultados são apresentados aos produtores em apenas uma folha de papel A4.

## **Resultados e Discussão**

Das 21 propriedades estudadas, cinco apresentaram EBTIDA negativo. Estas propriedades estão insolventes e devem parar a atividade produtiva se o resultado persistir nos meses subsequentes. A Margem de EBTIDA entre as 21 propriedades variou cerca de 460% no mês de julho, 190% no mês de agosto, 160% no mês de setembro, 240% no mês de outubro, 140% no mês de novembro e 100% no mês de dezembro.

O ROI variou 3,90% no mês de julho, 1,12% no mês de agosto, 1,41% no mês de setembro, 2,17% em outubro, 1,69% em novembro e 1,42% em dezembro. Cinco propriedades apresentaram resultado acima de 0,5% em julho, sete em agosto e em setembro, nove em outubro, também sete em novembro e dezembro. Já o Giro do Ativo foi 0,17 em julho, 0,19 em agosto, 0,18 em setembro, 0,19 em outubro, 0,18 em

novembro e 0,19% em dezembro. O EVA apresentou média no período de – R\$ 3.394,77, indicando que, na media, os produtores estudados perderam patrimônio.

Em média, o ponto de equilíbrio financeiro foi de 390 litros/dia entre julho e dezembro, o ponto de equilíbrio operacional foi de 618 litros/dia e o ponto de equilíbrio econômico foi 745 litros/dia.

Para o cálculo dos indicadores econômicos e financeiros acima citados utilizou-se alguns também indicadores de eficiência técnica e de qualidade do leite, como mostra a Tabela 1. Estes dois grupos de indicadores, em ultima análise, são os que impactam os indicadores econômicos e financeiros. Estes indicadores também são importantes para localizar e conhecer dentre as propriedades quais são os procedimentos gerenciais de melhor resultado, ou seja quais trazem eficiência econômica.

**Tabela 1.** Indicadores zootécnicos e de qualidade médios obtidos na amostragem.

Variáveis	Valores						
	Meses	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro
Vacas em Lactação/Rebanho (%)		32,68	32,05	32,27	30,98	33,26	30,30
Vacas em Lactação/Total (%)		76,53	74,22	77,70	75,92	74,81	75,47
Produção (litros/dia)		536	429	447	410	293	310
Produtividade Vaca (litros/dia)		13	14	14	15	14	14
Produtividade MObra (litros/dia)		271	342	233	267	297	281
Produtividade Terra (litros/dia)		7	8	7	5	5	6
Gastos Concentr/Receita Total (%)		35,38	36,19	43,80	32,25	42,31	36,42
Gastos MObra/Receita Total (%)		14	11	14	13	11	22
Perda por morte (%)		31,62	57,54	274,29	94,32	191,94	32,27
CCS (unidade)		216.390	209.000	220.223	226.856	294.856	311.229
CBT (unidade)		17.930	15.492	11.271	14.815	17.146	12.728
Gordura (unidade)		3,83	3,82	3,71	3,73	3,74	3,79
Proteína (unidade)		3,26	3,21	3,17	3,22	3,22	3,22

Fonte: dados da pesquisa

## Conclusões

O estudo analisou propriedades de gado leiteiro no período de julho a dezembro de 2012 a fim de testar conceitos financeiros e econômicos, visando analisar o desempenho mensal. A amostragem considerada neste estudo foi intencional, o que impede que os resultados obtidos sejam considerados representativos do universo de produtores brasileiros. Portanto, foram considerados somente produtores que têm forte vínculo econômico com a atividade leiteira. Ainda assim, em média, 23% das propriedades mostraram-se insolventes, nos meses analisados. Num outro extremo, 30% das propriedades obtiveram resultados muito favoráveis, o que garante sustentabilidade econômica. As demais, que foram a maioria dos casos obtidos na amostra, mostraram dificuldades para cobrir todos os gastos de produção.

Vale ressaltar, contudo, que os dados analisados referem-se ao levantamento de seis meses, portanto ainda é cedo para se fazer qualquer afirmação sobre a saúde financeira destas propriedades. O fato marcante deste estudo é que ficou demonstrado ser possível adotar em propriedades leiteiras abordagens metodológicas consagradas em outras atividades econômicas, mas que ainda não são utilizadas na atividade leiteira para aferição de desempenho. A aplicação desta metodologia nas propriedades irá possibilitar a obtenção de um conjunto de boas práticas de manejo e gestão que poderão trazer indicativos interessantes para os produtores, atendendo a uma antiga demanda do setor produtivo em relação à pesquisa, pois o Brasil ainda não tem sistemas de produção estáveis, padronizados, que sejam indicados aos produtores de modo seguro pelos técnicos. O Brasil ainda não tem, também, *benchmarks* que sejam referências para os produtores.

## **Agradecimentos**

A CNPq.

## **Literatura Citada**

IBGE. **Censo Agropecuário 2006**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil\\_2006/Brasil\\_censoagro2006.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf)>  
Acesso em: 5 mar. 2012.

IBGE. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia\\_visualiza.php?id\\_noticia=2093](http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=2093)>. Acesso em: 5 mar. 2012.

# **Representação de resultados das avaliações de classificação linear para características de tipo com o uso do *software* R**

## **Representing results of assessments of linear type traits classification using R-project software**

Leonardo Carvalho Nápolis Costa<sup>1</sup>, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva<sup>2</sup>, Rui da Silva Verneque<sup>3</sup>, Wagner Arbex<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduando de Sistemas de Informação. Bolsista de ICT – Fapemig. E-mail: leonardocnc@gmail.com

<sup>2</sup>Doutor em Zootecnia. Embrapa Gado de Leite. E-mail: marcos.vb.silva@embrapa.br

<sup>3</sup>Doutor em Estatística e Experimentação Agronômica. Embrapa Gado de Leite. E-mail: rui.verneque@embrapa.br

<sup>4</sup>Doutor em Engenharia de Sistemas e Computação. Embrapa Gado de Leite. E-mail: wagner.arbex@embrapa.br

**Resumo:** Este trabalho descreve o desenvolvimento de um procedimento para geração automática de gráficos para representação dos dados de características lineares de tipo de diversos animais. O procedimento foi desenvolvido com o uso do pacote matemático R, que gera gráficos do tipo *boxplot* com dados dos programas de melhoramento genético das raças Gir Leiteiro e Girolando. Com esses recursos, foi possível construir vários gráficos de forma simples e com grande grau de automação, evitando-se a intervenção manual direta sobre os dados para a geração dos próprios gráficos, como via-se anteriormente. Ao longo do desenvolvimento da estrutura e o uso dos procedimentos que o R oferece, chegou-se a conclusão de que a simplicidade e precisão são fatores determinantes para qualidade de um gráfico e entendimento da informação apresentada nos mesmos.

**Palavras-chave:** R project, *boxplot*, classificação linear, programa de melhoramento genético, Gir Leiteiro, Girolando.

**Abstract:** This paper describes the development of a procedure that generates automatic graphs which represent linear type traits data of various animals. The procedure was developed using the mathematical package R, it generates boxplot type of graphs for programs of animal breeding that include the breeds Dairy Gyr and Gyr-Holstein. With these features, it was possible to build multiple graphics with simplicity and with a high degree of automation, avoiding manual intervention directly on the data to generate graphs of their own, as could be seen earlier. Over development of the structure and use of procedures which R provides, came to the conclusion that the simplicity and accuracy are factors that determinate quality of a chart and understanding the information presented in them.

**Keywords:** R project, boxplot, linear type traits, animal breeding program, Dairy Gyr, Gyr-Holstein.

## **Introdução**

Existem vários programas que permitem a geração de gráficos, porém os que possuem requisitos específicos e necessários para representação eficiente e preciso dos dados, são poucos. O software R permite a manipulação de dados de várias formas, cálculos matemáticos e estatísticos dos mais diversos e a representação gráfica – como, por exemplo, o *boxplot* - para diversas necessidades de leitura e de interpretação. Além disso, mesmo que o gráfico desejado não se esteja disponível exatamente da forma como necessária, existe a possibilidade de se programar na própria linguagem do pacote R, para que o gráfico seja gerado da forma como desejada.

Os programas de melhoramento genético da Embrapa Gado de Leite necessitam de um meio para representar os resultados de sua metodologia de avaliação de determinados animais e,

assim, o R é uma ótima opção de uso, permitindo, por exemplo, a automação dos processos iterativos e a otimização de outras tarefas.

A meta inicial é implementar com o R um procedimento padrão na estruturação de gráficos para publicação do chamado “sumário de touros”, que traz o resultado do programa de melhoramento genético das diferentes raças, sendo que, cada raça que possui seu programa de melhoramento genético, tem seu próprio sumário.

O alcance dessa meta deve, então, permitir a otimização de processos no momento de geração dos diversos gráficos, a significativa diminuição do tempo de realização dessa tarefa e melhorar a estrutura e o modelo dos gráficos, fornecendo uma visualização mais precisa da informação representada.

## Material e Métodos

Para a representação gráfica dos resultados da avaliação das características lineares dos bovinos animais, utilizaram-se, nesta abordagem, o software R, gráfico do modelo *boxplot* e os próprios dados da avaliação de características lineares em bovinos, como descritos a seguir.

O R é um *software* “livre” (*free software*), inicialmente desenvolvido para uso em trabalhos estatísticos e matemáticos – mas, extrapolou essa expectativa – multiplataforma e, portanto, possui versões para diversos sistemas operacionais, tais como, GNU Linux, Microsoft Windows e Mac OS.

Integra rotinas prontas ou permite a programação de novas rotinas para manipulação de dados em geral, inúmeros cálculos matemáticos e estatístico, dos mais diversos graus de complexidade, e a geração gráficos, tanto por meio dos modelos já disponíveis, pela adaptação desses mesmos modelos ou, ainda, pela a programação de novos modelos.

Entre outras características, o R possibilita:

- a) a manipulação e armazenamento efetivo dos dados;
- b) o uso de operadores para cálculo sobre variáveis indexadas e cálculo matricial;
- c) a análise de dados com o uso de uma integrada coleção de ferramentas;
- d) a análise exploratória de dados pela visualização em tela ou por meio de impressão, com o uso de recursos gráficos;
- e) o desenvolvimento de rotinas com o uso de uma linguagem de programação robusta, simples e eficiente, que inclui estruturas condicionais, estruturas cíclicas, funções recursivas, e capacidade de entrada e saída de dados etc..

O R tem seu próprio “ambiente de processamento” – e, muitas vezes, recebe essa designação – caracterizando-o como um sistema completamente planejado e coerente, e não apenas como um conjunto ampliado de ferramentas específicas e rígidas, como é o caso de outros programas de análise de dados (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). Possui procedimentos estatísticos em milhares de pacotes livremente disponíveis na Internet e que podem ser carregados de acordo com a necessidade.

O gráfico *boxplot* – também, conhecido como *boxplot*, diagrama de caixa ou diagrama de *box-and-whisker* – é um gráfico que permite avaliar a simetria dos dados, sua dispersão e a existência ou não de *outliers* nos mesmos, sendo especialmente adequado para a comparação de dois ou mais conjuntos de dados correspondentes às categorias de uma variável qualitativa.

Para construir um *boxplot* são necessárias cinco estatísticas: valor mínimo, primeiro quartil, mediana ou segundo quartil, terceiro quartil e valor máximo. Deve ser conhecido que os quartis são estatísticas que dividem os dados ordenados em quatro conjuntos com a mesma quantidade de dados.

O gráfico do *boxplot*, tradicionalmente, é formado por uma “caixa” construída paralelamente ao eixo da escala dos dados, podendo ser horizontal ou vertical e, no presente trabalho, a caixa foi considerada no sentido horizontal. Essa caixa se inicia no primeiro quartil e termina no terceiro quartil e, interceptando a caixa, marca-se a posição da mediana. Dessa forma, a caixa descreve os 50% valores centrais da distribuição. Se for necessário ou desejado, pode-se acrescentar também a marcação da média, da mesma forma como a mediana.

Externamente à caixa, ou seja, à esquerda do primeiro quartil e à direita do terceiro quartil, marcam-se, respectivamente, o início e o fim dos chamados “valores não discrepantes” ou “valores típicos”, que são os valores relativamente próximos os demais. Assim, o que ficar “fora” do intervalo coberto pelos valores típicos, são chamados de “valores discrepantes” ou

“valores atípicos”, que são os valores muito afastados da grande maioria dos dados (FARIAS, 2010).

No presente trabalho, utilizou-se uma variante do *boxplot* onde os quartis não são marcados, assim, despreza-se o primeiro e o terceiro quartis e a avaliação de características lineares é representada pelos valores mínimo, médio e máximo dos valores típicos.

Entende-se como classificação linear a metodologia aplicada para avaliação das medidas de conformação dos animais utilizada pelas associações de criadores de gado leiteiro, que agrupa as características como corporais, pernas/pés e sistema mamário.

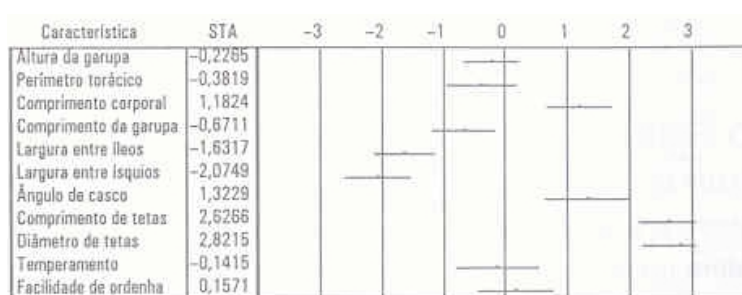
As características atualmente avaliadas nos programas de melhoramento genético das raças Gir Leiteiro e Girolando são: altura da garupa, perímetro torácico, comprimento do corpo, comprimento da garupa, largura entre os ísquios, largura entre os flos e ângulo da garupa no grupo das características corporais. Além dessas, no grupo de pernas/pés avaliam-se, o ângulo de cascos, posição das pernas e pernas e, no sistema mamário, o úbere anterior, úbere posterior, profundidade de tetos, comprimento de tetos, diâmetro de tetos, facilidade de ordenha, temperamento e comprimento do umbigo.

Estudos mostram que há influência dos fatores de meio ambiente como rebanho, ano e estação de classificação, estágio da lactação, idade ou ordem do parto, classificador, entre outros, sobre as características lineares de tipo. Assim, identificar e quantificar os fatores de meio ambiente que influenciam as características consideradas na classificação linear para tipo podem, por meio da seleção de animais funcionais e produtivos, auxiliar no aumento da produção leiteira (ESTEVES, BERGMANN, DURÃES, COSTA, SILVA; 2004).

## Resultados e Discussão

Os primeiros dados relativos às características lineares para avaliação de tipo, nos programas de melhoramento genético das raças Gir Leiteiro e Girolando, começaram a ser mensurados e armazenados, respectivamente, em meados dos anos 90 e na segunda metade da última década. Dessa forma, as avaliações para essas características começaram a ser publicadas no fim da década de 90, para a raça Gir Leiteiro, e no início dessa década para a raça Girolando, o que exigem uma forma de representação gráfica e uma das formas adotadas internacionalmente é o uso de gráficos, como o *boxplot*.

Como mostrado, a construção do *boxplot* exige diversos detalhes e, portanto, faz com que seu “desenho” seja trabalhoso e acompanhado de muito critério. Inicialmente, os gráficos eram gerados com o uso de planilhas eletrônicas e com muita intervenção manual e, portanto, o resultado trazia pouca precisão, o que prejudicava a sua leitura e interpretação como pode ser visto nas Figuras 1, 2, 3 e 4.



**Figura 1.** Gráfico *boxplot* para o resultado das avaliações de classificação linear para tipo utilizado no programa de melhoramento genético da raça Gir Leiteiro, no fim da década de 90 até o início dos anos 2000.

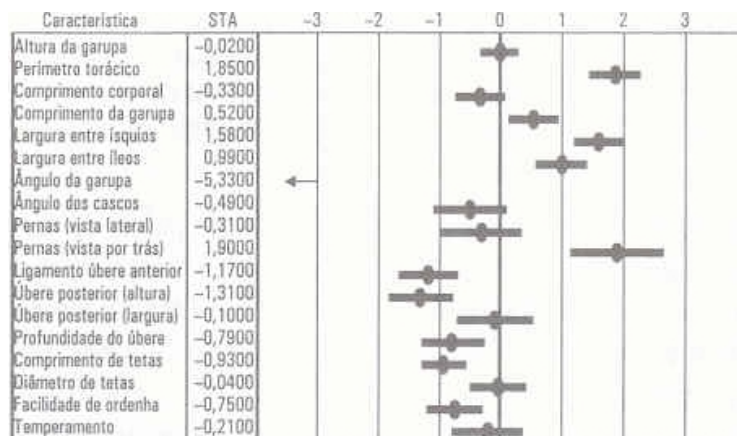


Figura 2. Gráfico *boxplot* para o resultado das avaliações de classificação linear para tipo utilizado no programa de melhoramento genético da raça Gir Leiteiro, em meados da última década.

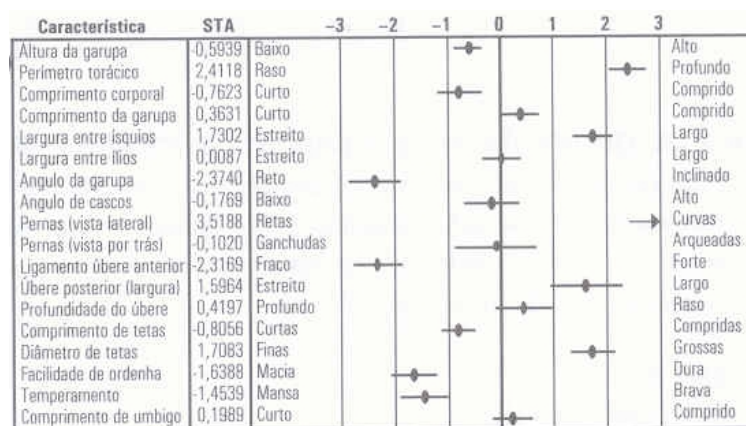


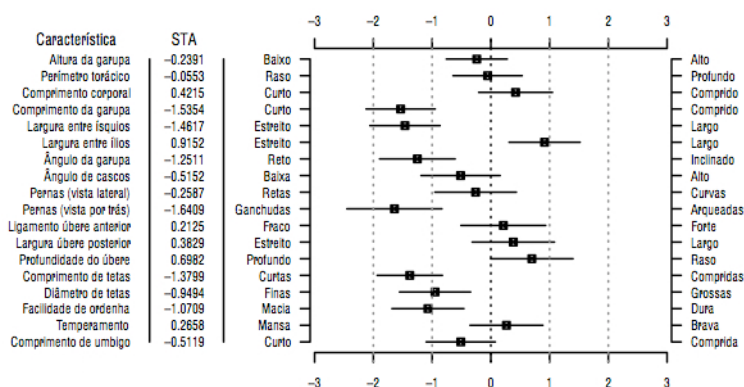
Figura 3. Gráfico *boxplot* para o resultado das avaliações de classificação linear para tipo utilizado no programa de melhoramento genético da raça Gir Leiteiro, em 2011.



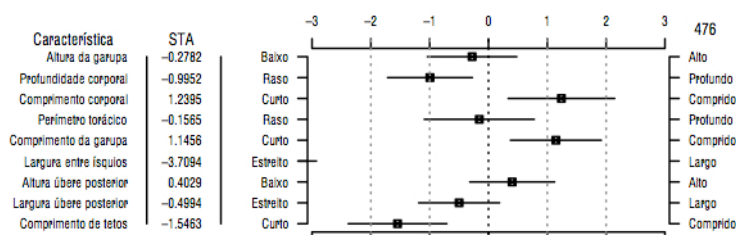
Figura 4. Gráfico *boxplot* para o resultado das avaliações de classificação linear para tipo utilizado no programa de melhoramento genético da raça Girolando, em 2011.

Com a utilização das ferramentas adequadas, já apresentadas na seção Material e Métodos, foi possível alcançar um novo padrão gráfico e tipográfico e, notadamente, percebem-se diferenças na estrutura e modelos dos gráficos (Figura 5 e 6), tornando-os mais precisos e, como consequência, favorecendo a leitura e interpretação dos mesmos.





**Figura 5.** Gráfico *boxplot* para o resultado das avaliações de classificação linear para tipo utilizado no programa de melhoramento genético da raça Gir Leiteiro, em 2012.



**Figura 6.** Gráfico *boxplot* para o resultado das avaliações de classificação linear para tipo utilizado no programa de melhoramento genético da raça Girolando, em 2012.

O procedimento para criação automatizada desses gráficos não trouxe benefícios somente para àqueles que lêem o conteúdos dos sumários e fazem uso de suas informações, mas, também trouxe melhorias sob a ótica de operacionalização do seu processo de construção.

Com a implantação desse procedimento, evita-se algumas etapas em que eram necessárias intervenções manuais diretas, tanto no preparo dos dados como na confecção do próprio gráfico, permitindo otimizar etapas do processamento dos dados, reduzir o tempo dispendido nesse processo e, ainda, maior controle sobre a estrutura e modelo do gráfico.

## Conclusões

De forma ampla, a representação de qualquer conteúdo por meio de um gráfico requer que dados sejam transformados em pontos que, por sua vez, são distribuídos entre os eixos da dimensão que se quer trabalhar. Assim, em geral, esses pontos são alocados no plano cartesiano e assim permitem a interpretação de alguma informação, inferida a a partir da leitura do gráfico.

Entretanto, sua interpretação será tão útil e atrativa quanto forem precisas as marcações dos pontos na estrutura do gráfico e, além disso, deve-se primar pela simplicidade no modelo do gráfico, pois, uma imagem com abundância de informações gráficas, pode prejudicar o seu entendimento.

Existem vários tipo, estruturas e modelos de gráficos, que se diferem por sua adequação ao representarem diferentes resultados de diferentes estudos e experimentos. Além disso, sua construção deve ser factível e rápido, dentro da necessidade da tarefa a ser realizada.

O procedimento ora apresentado, com a utilização de recursos computacionais de *software* adequados e gratuitos, possibilita uma eficiente maneira de construção dos gráficos, agregada às metas de sejam obtidos bons resultados, em curto prazo, na geração dos gráficos *boxplot* para a leitura e interpretação dos resultados das avaliações para classificação linear de tipo dos programas de melhoramento genético de bovinos da Embrapa Gado de Leite

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Gado de Leite, onde esse trabalho foi desenvolvido, e à Fapemig pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica e Tecnológica, ao CNPq.

### **Literatura Citada**

ESTEVES, A. M. C., BERGMANN, J. A. G., DURÃES, M. C., COSTA, C. N., SILVA, H. M. Estudo dos efeitos de ambiente sobre as características lineares de tipo em rebanhos bovinos da raça Holandesa. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, Belo Horizonte, v. 56, n. 4, Aug. 2004.

FARIAS, A. M. L. **Probabilidade condicional**. UFF. Niterói, 2010. (Notas de aula de Conteúdos Digitais em Matemática e Estatística).

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012. (ISBN 3-900051-07-0).

# **Avaliação das frequências genotípica e alélica de DUMPS em touros da raça Girolando**

## **Evaluation of genotypic and allelic frequencies of DUMPS in Girolando bulls**

Isabela Gomes Barreto da Motta<sup>1</sup>, Willian de Pascoa Pereira<sup>1</sup>, Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>2</sup>, Isabela Fonseca<sup>3</sup>, Wagner Antônio Arbex<sup>4</sup>, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva<sup>5</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Alunos de Graduação do Curso de Ciências Biológicas - CES-JF/Juiz de Fora. e-mail: mottaigb@hotmail.com; willp\_2@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutoranda em Genética e Biotecnologia – UFJF/Juiz de Fora. Bolsista Capes. e-mail: isabellasp@gmail.com

<sup>3</sup>Doutoranda em Genética e Melhoramento - UFV/Viçosa. Bolsista CNPq. e-mail: isabela\_fonseca@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Analista da Embrapa Gado de Leite. e-mail: wagner.arbex@embrapa.br

<sup>5</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. e-mail: marcos.vb.silva@embrapa.br; marta.martins@embrapa.br

**Resumo:** A Deficiência de Uridina Monofosfato Sintetase (DUMPS) é uma doença autossômica de caráter recessivo e caracteriza-se por uma mutação que ocorre no códon 405 do gene *UMPS* com a troca de uma citosina por uma timina, acarretando na deficiência da enzima UMP. Embriões homozigotos recessivos morrem em média até o 40<sup>a</sup> dia do período gestacional, em contrapartida, animais heterozigotos são assintomáticos. Dessa forma, objetivou-se estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene *UMPS* nos animais participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando e verificar se a população está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Para isso foram genotipados 189 touros por meio da técnica de PCR-RFLP e os resultados observados estão próximos aos esperados indicando que a população está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

**Palavras-chave:** ácido orótico, mutação, pirimidina, progênie.

**Abstract:** The Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS) is an autosomal recessive disorder and it is characterized by a mutation which occurs in the codon 405 of the gene *UMPS* by the exchange of a cytosine for a thymine, causing a deficiency in the enzyme UMP. Recessive homozygous embryos die up to the 40<sup>th</sup> day of pregnancy on the other hand heterozygous animals are asymptomatic. The objective was to estimate the allelic and genotypic frequencies of gene *UMPS* in animals participating of the Progeny Test of Girolando Breed and verify if the population is in *Hardy-Weinberg* equilibrium. 189 bulls were genotyped using PCR-RFLP method. The observed results are similar to those expected indicating that the population is in *Hardy-Weinberg* equilibrium.

**Keywords:** mutation, orotic acid, progeny, pyrimidine.

### **Introdução**

A Deficiência de Uridina Monofosfato Sintetase (DUMPS) é uma doença autossômica monogênica de caráter recessivo, sendo inicialmente observada em gado da raça Holandesa nos Estados Unidos e, devido ao intenso uso do sêmen destes animais, atualmente, essa doença é encontrada em outros países (GHANEM et al., 2006; PATEL et al., 2006).

A DUMPS é caracterizada por uma mutação que ocorre no códon 405 do gene *UMPS* com a troca de uma citosina por uma timina, acarretando na deficiência da enzima UMP (SCHWENGER et al., 1993). Esta enzima é a principal responsável por catalisar as duas últimas etapas da síntese de novo de nucleotídeos de pirimidina com a conversão do ácido orótico em uridina monofosfato (SHANKS e ROBINSON, 1989).

As pirimidinas são essenciais para a síntese de DNA e RNA sendo necessária em altas quantidades durante o desenvolvimento embrionário. Embriões homozigotos recessivos para o alelo mutante morrem em média até o 40º dia do período gestacional devido à baixa síntese dos ácidos nucleicos, enquanto animais heterozigotos são assintomáticos (SCHWENGER et al., 1994). Na maioria dos casos, animais heterozigotos apresentam metade da atividade normal de síntese de UMP em eritrócitos e em diversos tecidos, além de excretarem elevados níveis de ácido orótico no leite e urina (SHANKS e ROBINSON, 1989; SCHWENGER et al., 1993). Para evitar o cruzamento entre indivíduos portadores, além da genotipagem, também é possível a realização de testes que medem a atividade de UMPS em eritrócitos.

O estudo de DUMPS apresenta grande importância para o melhoramento animal e está diretamente relacionado à criação de gado leiteiro já que a presença deste gene na população pode refletir em prejuízos aos produtores. Este estudo foi realizado com o objetivo de estimar as frequências alélicas e genotípicas do gene *UMPS* em animais participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando bem como avaliar se a população está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (EHW).

## Material e Métodos

Foram genotipados 189 touros, participantes do Programa de Melhoramento da Raça Girolando, coordenado pela Embrapa Gado de Leite e Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. Foram coletadas amostras (sêmen e/ou sangue) para a extração do DNA e foi utilizado o *DNasey® Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação das amostras de DNA foi feita por espectrofotometria usando o NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). A identificação dos animais foi realizada através da técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) na qual foram utilizados dois *primers* (um *forward* e um *reverse*) descritos por Schwenger e colaboradores (1993) e a amplificação do produto da PCR foi realizada no Termociclador *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystem, Foster City, CA, EUA).

Para a digestão do produto da PCR foi utilizada a enzima *Ava I* (Promega Corporation, Foster City, CA, EUA) e o diagnóstico foi realizado em gel de agarose 3% corado com brometo de etídio. Em animais não portadores (TD) é possível observar uma banda de 53 e uma de 36 pb, já em animais portadores (DP) observam-se as bandas de 89, 53 e 36 pb. As frequências alélicas, genotípicas e o cálculo da probabilidade de EHW foram determinados por meio do programa Popgen 1.32 (YEH et al., 1997). A probabilidade de EHW, associada às frequências genotípicas observadas, foi testada pelo teste  $\chi^2$  (Qui-Quadrado) ao nível de significância de 5%.

**Tabela1.** *Primers* descritos por Schwenger e colaboradores (1993).

---

S09: 5'-GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG-3'
S09: 5'-GCAAATGGCTGAAGAACATTCTG-3'

---

## Resultados e Discussão

As frequências genotípicas encontradas para os genótipos TD e DP foram 1,00 e 0,00, respectivamente e as frequências alélicas foram 1,00 para o alelo T e de 0,00 para o alelo D. As frequências observadas encontram-se em concordância com as esperadas, indicando que a população estudada está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

O resultado obtido no presente estudo corrobora os resultados encontrados em estudo realizado por Patel e colaboradores (2006) com animais de raça Holandesa.

**Tabela 1.** Frequências genotípicas, alélicas e probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Gene	Genótipo	Número de animais		Frequência		EHW *
		Observado	Esperado	Genotípica	Alélica	
UMPS	TD	189	189	1,00	1,00	0
	DP	0	0	0,00	0,00	

\* $P > 0,05$

## Conclusões

Os dados obtidos mostram que a população estudada se encontra em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*, condição confirmada estatisticamente ( $P > 0,05$ ).

## Agradecimentos

Ao CNPq. Agradeço a Dra. Marta Martins pela oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Genética Molecular. A Isabela Fonseca e Isabella Barreto pela paciência e por todo o conhecimento transmitido e aos demais companheiros do laboratório, Willian e Alessa, pela amizade. Agradeço também a equipe de Genética Molecular do Dr. Marco Antonio.

## Literatura Citada

GHANEM, M. E.; NAKAOA, T.; NISHIBORI, M. Deficiency of uridine monophosphate synthase (DUMPS) and X-chromosome deletion in fetal mummification in cattle. **Animal Reproduction Science**, v. 91, p. 45-54, 2006.

PATEL, R. K.; SINGH, M. K.; SONI, K. J.; CHAUHAN, J. B.; RAO, K. R. S. S. Lack of carriers of citrullinaemia and DUMPS in Indian Holstein cattle. **Journal of Applied Genetics**, v. 47, n.3, p. 239-242, 2006.

SCHWENGER, B.; SCHOBBER, S.; SIMON, D. DUMPS Cattle Carry a Point Mutation in the Uridine Monophosphate Synthase Gene. **Genomics**, v. 16, p. 241-244, 1993.

SCHWENGER, B.; TAMMEN, I.; AURICH, C. Detection of the homozygous recessive genotype for deficiency of uridine monophosphate synthase by DNA typing among bovine embryos produced in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 100, p. 511-514, 1994.

SHANKS, R. D. e ROBINSON, J. L. Embryonic Mortality Attributed to Inherited Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p.3035-3039, 1989.

YEH, F. C.; YANG, R. C.; BOYLE, T. B. J.; YE, Z. H.; MAO, J. X. POPGEN (VERSION 1.32): Software Microsoft Windows-based freeware for population genetics analysis. Alberta: **University of Alberta**, 1997.

## Estabilidade genômica em uma população hexaploide híbrida (capim-elefante X milheto)

Tatiana Aparecida Silva<sup>1</sup>, Marco Antônio Machado<sup>2</sup>, Juliane Dornellas Nunes<sup>3</sup>, Ana Luisa Sousa Azevedo<sup>2</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>2</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>2</sup>, Emanuel Masiero da Fonseca<sup>4</sup> e Antônio Vander Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estagiária Bolsista do CNPq, e-mail: tatibiosocial@bol.com.br

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, e-mails: marco.machado@embrapa.br, ana.azevedo@embrapa.br, juarez.machado@embrapa.br, francisco.ledo@embrapa.br, vander.pereira@embrapa.br.

<sup>3</sup>Pós-doutoranda da Embrapa Gado de Leite, e-mail: judornellas@gmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, email: emmanuel\_fonseca\_1990@yahoo.com.br

**Resumo:** O gênero *Pennisetum* possui várias espécies de grande valor econômico, sendo o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*Pennisetum glaucum*) as espécies mais estudadas. Devido à proximidade genética entre tais espécies, é possível obter híbridos com relativa facilidade. O híbrido resultante do cruzamento é triploide e estéril, porém apresenta grande interesse para fins forrageiros, pois reúne características como resistência a seca e alta produção de matéria seca, além disso, a esterilidade pode ser revertida através da duplicação cromossômica. O presente trabalho teve como objetivo analisar características morfológicas dos cromossomos de híbridos interespecíficos hexaploides entre capim-elefante e milheto. Através dos resultados foi possível a caracterização do comprimento total do lote haploide dos cromossomos dos seis híbridos interespecíficos estudados, na qual os híbridos PCM-0701-11, PCM0701-22, PCM0701-31 e PCM0701-32 apresentaram metáfases completas com  $2n=42$  cromossomos e os híbridos PCM0701-34 e PCM0701-35 foi observada a presença de metáfases incompletas, com o número de cromossomos variando entre 38 a 42, tornando-os mixoploides.

**Palavras-chave:** cromossomos, capim-elefante, milheto.

**Abstract:** The genus *Pennisetum* have several species of high economic value, the napier grass (*Pennisetum purpureum*) and pear millet (*Pennisetum glaucum*) are the most studied species. Due to genetic proximity between these species it is possible to obtain hybrids with relative facility. The hybrid obtained is triploid and sterile, however this hybrid show great interest for forage purposes, because have characteristics like drought tolerance and high production of dry matter, besides this, the sterility could be reverted through chromosome duplication. This study aimed to analyze morphometric characteristics of the chromosomes of interspecific hybrids between hexaploid elephant grass and pearl millet. It was possible to characterize the length of the haploid lot of six interspecific hybrids studied, the hybrids PCM-0701-11, PCM0701-22-31 and PCM0701 PCM0701-32 showed complete metaphases with  $2n = 42$  chromosomes and the hybrids PCM0701 and PCM0701-34-35 showed incomplete metaphases with chromosome numbers ranging from 38 to 42, making them mixoploids.

**Keywords:** chromosomes, elephant grass, pear millet.

### Introdução

O gênero *Pennisetum* está entre os mais importantes da família Poaceae, possuindo aproximadamente 140 espécies. Diversas espécies apresentam grande valor econômico, como o capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*Pennisetum glaucum*). Uma estratégia comumente usada e recomendada para o melhoramento genético de *Pennisetum* é a hibridação interespecífica. Devido à proximidade genética entre o capim-elefante e o milheto é possível a obtenção de híbridos com relativa

facilidade (SOUSA SOBRINHO et al, 2005). Contudo, este híbrido é triploide e estéril, dificultando sua propagação via sementes. A restauração da fertilidade pode ser obtida através do uso de agentes antimitóticos, produzindo então híbridos hexaploides com meiose regular. Dessa forma, a Embrapa Gado de Leite desenvolve um programa de melhoramento utilizando a técnica acima citada.

A duplicação cromossômica causa alterações genéticas nas plantas, como os fenômenos da poliploidia e mixoploidia decorrentes da variação no número de cromossomos (ABREU, 2002). O presente trabalho teve como objetivo realizar a análise cariotípica e verificar a sua relação com mudanças morfométricas decorrentes do processo de poliploidização.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Juiz de Fora, MG. Foi realizada a análise citogenética de seis híbridos interespecíficos hexaploides de propagação vegetativa pertencentes ao gênero *Pennisetum* (PCM0701-11, PCM0701-22, PCM0701-31, PCM0701-32, PCM0701-34, PCM0701-35).

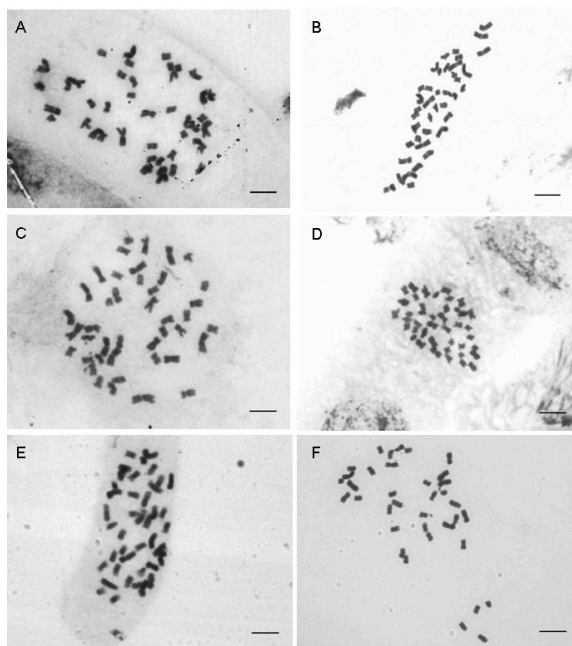
O preparo das lâminas foi feito através dos métodos de secagem ao ar e esmagamento. As raízes utilizadas foram obtidas a partir de estacas. Foram selecionadas cinco metáfases/genótipo para obtenção dos parâmetros morfométricos dos cromossomos. A captura de imagens foi realizada através de microcâmera digital acoplada ao microscópio Olympus BX-60. As imagens foram processadas pelo programa *Image Pro Plus*. Os cromossomos foram medidos através do Programa *Image Tool 3.0 UTHSCSA*. Tal medição foi feita a partir da extremidade do braço longo (BL) até o centrômero, inclusive constrições secundárias quando presentes e da extremidade do braço curto (BC) até centrômero. Foram obtidos os valores de: braço longo (BL), braço curto (BC), comprimento total do cromossomo ( $CTi = BL + BC$ ), relação de braço ( $RB = BL/BC$ ), comprimento total do lote haploide ( $CTLH = \sum CTi/2$ ), comprimento relativo ( $CR = CTi/CTLH \times 100$ ). Os cromossomos foram organizados e numerados em ordem decrescente de tamanho e identificaram-se os pares homólogos. A classificação morfológica dos cromossomos foi realizada de acordo com Guerra (2003).

## Resultados e Discussão

Através da análise cariotípica foi possível caracterizar o comprimento total do lote haploide (CTLH) dos híbridos interespecíficos de *Pennisetum* estudados. Foi possível observar a existência de diferenças significativas entre o complemento total do lote haploide dos seis híbridos interespecíficos avaliados. O genótipo PCM0701-31 apresentou a maior média de CTLH enquanto o genótipo PCM0701-32 apresentou menor média. O coeficiente de variação da análise para o CTLH se manteve abaixo de 20%, conferindo boa precisão experimental aos dados segundo Pimentel Gomes (1990). Os cariótipos de todos os híbridos apresentaram apenas cromossomos metacêntricos e submetacêntricos, não foram observados cromossomos acrocêntricos (a) e telocêntricos (t).

Quanto ao comprimento relativo, no genótipo PCM0701-32, o cromossomo maior apresentou média de 7,87% do comprimento do lote haploide, demonstrando ser 3,14 vezes maior que o menor cromossomo, cuja média do comprimento relativo representou 2,50% do comprimento do lote cromossômico, sendo esta a maior diferença dentre os seis genótipos avaliados. A menor diferença encontra-se no genótipo PCM0701-34, em que o maior cromossomo apresentou comprimento relativo médio de 7,72%, sendo 2,45 vezes maior que o menor cromossomo, no qual a média do comprimento relativo foi 3,14%. Ao realizar análise cariotípica em híbridos hexaploides de capim-elefante e milheto, Campos (2007) observou que o comprimento relativo dos cromossomos variou entre 7,11% no primeiro par de cromossomos até 3,28% no vigésimo primeiro par de cromossomos do híbrido hexaploide. Os resultados indicaram que a eliminação de sequências de DNA em híbridos hexaploides pode derivar de conflitos intergenômicos.

Foi observada variação no comprimento total dos cromossomos, tal variação pode ser decorrida possivelmente da diferença no grau de condensação dos cromossomos.



**Figura 1.** Metáfases dos híbridos hexaploides analisados PCM 0701-11 (A), PCM-0701-22 (B), PCM 0701-31 (C), PCM0701- 32 (D), PCM 0701-34 (E) e PCM 0701- 35, com 36 cromossomos(F). As barras representam 10  $\mu$ m.

Dos seis genótipos analisados, os híbridos PCM0701-11, PCM0701-22, PCM0701-31 e PCM0701-32 apresentaram  $2n=42$  cromossomos, contudo nos híbridos PCM0701-34 e PCM0701-35 foi observada a presença de metáfases incompletas, com o número de cromossomos variando de 38 a 42, tornando-os mixoploides (Figura 1). A mixoploidia em híbridos de *Pennisetum* pode ser resultado da eliminação de cromossomos individuais ou de genomas completos, sendo relatada também por outros autores (LEÃO et al; 2011; CAMPOS, 2007). A identificação de metáfases incompletas reforça a teoria de existência de eliminação cromossômica em híbridos duplicados. Dessa forma, para otimizar o processo de seleção de genótipos superiores, uma das características que devem ser levadas em consideração é a estabilidade genômica. Essa característica pode ser avaliada facilmente através da citometria de fluxo, ou seja, é possível analisar grandes populações e determinar quais os genótipos são mais estáveis. Essa informação juntamente com as avaliações agronômicas servirá de base para a seleção de genótipos superiores que contribuirão para a formação das próximas gerações.

## Conclusões

A análise cariotípica revelou a presença de variações numéricas e morfométricas entre os genótipos analisados. Dessa forma, é possível afirmar que existe eliminação de cromossomos após os eventos de hibridação e duplicação do DNA em híbridos (capim-elefante x milho).

## Agradecimentos

Ao CNPq, Fapemig e Unipasto pelo apoio financeiro ao projeto.



## Literatura citada

ABREU, J. C. **Mixoploidia em híbridos de capim-elefante x milheto tratados com agentes antimitóticos**. 2002. 72p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras.

CAMPOS, J. M. S. **Obtenção de híbridos hexaploides e análise genômica em *Pennisetum sp.* por citometria de fluxo**. 2007. 115f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas)- Universidade Federal de Lavras, Lavras.

GUERRA, M. S. **Variação e evolução cromossômica: variação numérica**. Introdução à citogenética geral. Guanabara Koogan. 2003. 142p.

LEÃO, F. F.; DAVIDE, L. C.; CAMPOS, J. M. S.; PEREIRA, A. V.; BUSTAMANTE, F. O. Genomic behavior of hybrid combinations between elephant grass and pearl millet. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.46, n.7, p.712-719, jul. 2011.

PIMENTEL, GOMES F. **Curso de estatística experimental**. 13. Ed. Piracicaba: Nobel, 1990. 468 p.

SOUZA SOBRINHO, F. de; PEREIRA, A.V.; LÉDO, F.J. da S.;BOTREL, M. de A.; OLIVEIRA, J.S.; XAVIER, D.F. Avaliação agronômica de híbridos interespecíficos entre capim-elefante e milheto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 40, p. 873-880, 2005.

# Caracterização fenotípica de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de mastite bovina

## Phenotypic characterization of coagulase negative staphylococci isolated from bovine mastitis

Carla Christine Lange<sup>1</sup>, Maria Aparecida V. P. Brito<sup>1</sup>, Fabiana Santos da Silva<sup>2</sup>, Mariana Caroline T. Alvim<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

<sup>2</sup>Graduada em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES/JF)

<sup>3</sup>Mestranda em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa (UFV)

**Resumo:** Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina. A presença de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) na glândula mamária está, geralmente, associada a quadros moderados de inflamação e embora sejam reportadas em casos de mastite bovina, a identificação das outras espécies de *Staphylococcus*, que não *S. aureus*, na maioria das vezes não é realizada. O objetivo deste estudo foi testar um esquema simplificado de caracterização fenotípica para a identificação de espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) identificados em estudo anterior pelo sequenciamento do gene rDNA 16S. As características analisadas em 70 isolados foram o aspecto da colônia, presença de hemólise, produção de coagulase e DNase, produção de acetoina, reação de CAMP com *S. intermedius*, utilização de manitol e trealose, presença de citocromo-oxidase e sensibilidade à novobiocina. Algumas características apresentaram resultados típicos, mas não foram suficientes para a identificação das seis espécies de SCN isoladas de mastite bovina, podendo apenas auxiliar na identificação de isolados destas espécies.

**Palavras-chave:** *Staphylococcus* spp., testes fenotípicos, infecção intramamária.

**Abstract:** Bacteria of the genus *Staphylococcus* are among the main pathogens of bovine mastitis. The presence of coagulase negative staphylococci (CNS) in the mammary gland is generally associated with moderate inflammation and although they are reported in bovine mastitis, the identification of other species of *Staphylococcus* different from *S. aureus*, in most cases is not performed. The objective of this study was to test a simplified scheme of phenotypic characterization to identify species of coagulase negative *Staphylococcus* (SCN) identified in a previous study by 16S rDNA sequencing. Phenotypic characteristics of 70 coagulase-negative staphylococci isolated from bovine mastitis were analyzed. These characteristics were colonial appearance, presence of hemolysis, coagulase and acetoin production, DNase activity, CAMP reaction with *S. intermedius*, acid production from mannitol and trehalose, presence of the cytochrome oxidase system and sensitivity to novobiocin. The phenotypic characteristics analyzed were not sufficient to identify the six species of coagulase-negative *Staphylococcus*. They can however help in the identification of isolates of these species.

**Keywords:** *Staphylococcus* spp., phenotypic tests, intramammary infection.

### Introdução

Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina. Entre as espécies mais frequentemente isoladas, *S. aureus* é um patógeno primário, responsável por infecções clínicas e subclínicas e altas contagens de células somáticas (CCS) no leite. As demais espécies de *Staphylococcus*, em sua maioria não produtoras de coagulase, compreendem cerca de 40 espécies e subespécies. A presença de *Staphylococcus* coagulase negativos (SCN) na glândula mamária está, geralmente, associada a quadros moderados de inflamação. Entretanto, em rebanhos com baixa CCS essas bactérias contribuem para o aumento da CCS do leite total do rebanho.

O desenvolvimento de diferentes técnicas de biologia molecular viabilizou a busca de métodos mais eficazes de identificação e caracterização de microrganismos. O sequenciamento do gene do 16S RNA ribossomal tem sido extensivamente usado com finalidade taxonômica e filogenética. Em estudo recente conduzido por Lange et al. (2011a), espécies de *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina foram identificadas com sucesso pelo sequenciamento do rDNA 16S. Os estudos foram ampliados, culminando com a identificação de seis espécies de *Staphylococcus* de mastite pelo sequenciamento do rDNA 16S, além de *S. aureus* (LANGE et al., 2011b). Como o sequenciamento de ácidos nucleicos é uma técnica restrita a alguns laboratórios, o objetivo deste estudo foi testar um esquema simplificado de caracterização fenotípica para a identificação destas seis espécies de SCN, que pudesse ser utilizado na rotina de diagnóstico da mastite bovina.

## Material e Métodos

### Isolados bacterianos

Foram analisadas 70 estirpes de *Staphylococcus* spp. coagulase negativos isolados de quartos mamários individuais de fêmeas bovinas provenientes de rebanhos localizados na Zona da Mata de Minas Gerais. As bactérias pertencem à Coleção de Microrganismos de Interesse para o Agronegócio do Leite da Embrapa e foram identificadas pelo sequenciamento parcial do gene rDNA 16S (LANGE et al., 2011b), pertencendo às seguintes espécies: *S. chromogenes* (n=31), *S. sciuri* (n=11), *S. haemolyticus* (n=7), *S. epidermidis* (n=7), *S. simulans* (n=7) e *S. hyicus* (n=7).

### Caracterização fenotípica

Os isolados bacterianos foram submetidos a testes fenotípicos, onde foram analisadas as seguintes características: aparência da colônia, presença de hemólise, produção de coagulase em tubo, resistência à novobiocina, presença de hemólise sinérgica com *S. intermedius* (CAMP), produção de acetoina (teste de *Voges-Proskauer* – VP) e de DNase (Desoxirribonuclease), utilização de trealose e manitol, e presença de citocromo-oxidase. Os testes foram realizados de acordo com Thorberg e Brändström (2000) e Bannerman (2003). Cepas Padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC) foram usadas como controles positivos e negativos.

## Resultados e Discussão

Os resultados dos testes fenotípicos realizados com os 70 isolados de SCN estão disponíveis na Tabela 1. *S. chromogenes* apresentou colônias de coloração creme ou amarelada, muitas vezes com aspecto mucóide. A maioria dos isolados (29/31) produziu DNase. *S. sciuri* apresentou colônias brancas ou amarelas, estas últimas com aspecto mucóide. Todos os isolados apresentaram resistência à novobiocina e quatro isolados (4/11) apresentaram reação positiva no teste da oxidase. A resistência à novobiocina diferenciou *S. sciuri* das outras cinco espécies analisadas neste estudo.

*S. haemolyticus* apresentou colônias com coloração creme ou amarela e hemólise fraca. A maioria dos isolados (6/7) produziu acetoina e todos produziram DNase. *S. epidermidis* apresentou colônias pequenas, brancas ou acinzentadas. A maioria dos isolados (6/7) produziu acetoina. *S. simulans* apresentou colônias brancas e a maioria dos isolados utilizou manitol (4/7) e trealose (7/7). *S. hyicus* apresentou colônias grandes e brancas. A maioria dos isolados (6/7) produziu DNase e três isolados foram coagulase positivos, sendo este último um resultado esperado, por se tratar de uma espécie coagulase-variável (TAPONEN et al., 2012).

**Tabela 1.** Características fenotípicas analisadas em 70 isolados de *Staphylococcus* coagulase negativos de mastite bovina.

Identificação*	Nº	Hem	Coag	VP	CAMP	Man	Tre	DNase	Oxi	Novo
<i>S. chromogenes</i>	31	- (31/31)	- (31/31)	- (30/31)	- (26/31)	- (26/31)	- (25/31)	+ (29/31)	- (31/31)	S (31/31)
<i>S. sciuri</i>	11	- (11/11)	- (11/11)	- (11/11)	- (11/11)	- (11/11)	- (11/11)	- (7/11)	+ (4/11)	R (11/11)
<i>S. haemolyticus</i>	7	+ (7/7)	- (7/7)	+ (6/7)	+ (6/7)	- (7/7)	- (6/7)	+ (7/7)	- (7/7)	S (7/7)
<i>S. epidermidis</i>	7	- (7/7)	- (7/7)	+ (6/7)	- (4/7)	- (7/7)	- (7/7)	- (6/7)	- (7/7)	S (7/7)
<i>S. simulans</i>	7	- (7/7)	- (7/7)	- (6/7)	- (5/7)	+ (4/7)	+ (7/7)	- (5/7)	- (7/7)	S (7/7)
<i>S. hyicus</i>	7	- (7/7)	- (4/7)	- (6/7)	- (7/7)	- (6/7)	- (5/7)	+ (6/7)	- (7/7)	S (7/7)
Total:	70									

\* Por sequenciamento do rDNA 16S (LANGE et al., 2011b). – reação negativa; + reação positiva; Hem-hemólise; Coag-coagulase; VP-produção de acetoina; CAMP-hemólise sinérgica com *S. intermedius*; Man-manitol; Tre-trealose; DNase-desoxirribonuclease; Oxi-oxidase; Novo-novobiocina.

Embora o fator CAMP com *S. intermedius* tenha sido observado em alguns isolados, os resultados não foram considerados na análise final porque a bactéria-padrão não apresentou beta-hemólise. As características fenotípicas que apresentaram resultados típicos, ou seja, aqueles esperados para a espécie analisada foram o aspecto da colônia, hemólise, produção de coagulase, acetoina e susceptibilidade à novobiocina. As cinco características podem apenas sugerir a identidade de um isolado, mas não fornecem uma identificação definitiva do mesmo.

Iorio et al. (2007) testaram um esquema simplificado composto de nove testes fenotípicos para a identificação de SCN de origem humana, obtendo uma acurácia de 98,5% quando comparado com a metodologia de referência (BANNERMAN, 2003), que utiliza 22 testes. Os testes utilizados neste esquema simplificado foram: *clumping factor*, pirrolidonil arilamidase, urease, fosfatase alcalina, utilização de manose, trealose e xilose, susceptibilidade à novobiocina e à desferrioxamina. O estudo de Iorio et al. (2007) não incluiu as espécies *S. simulans*, *S. chromogenes* e *S. hyicus*, isoladas comumente de mastite bovina. Este esquema poderá servir de base para estudos futuros enfocando a identificação de SCN de mastite bovina por meio de um número reduzido de testes fenotípicos.

## Conclusão

As características fenotípicas analisadas não foram suficientes para a identificação das seis espécies de *Staphylococcus* coagulase negativos isolados de mastite bovina. Novos testes fenotípicos deverão ser avaliados quanto à capacidade de identificação e diferenciação das espécies de SCN isoladas de mastite bovina, bem como a viabilidade de execução destes testes em laboratórios de diagnóstico veterinário.

## Agradecimentos

À Embrapa e Fapemig pelo apoio financeiro (MP 01.09.01.003.05.02 e CVZ APQ 00165/11). Ao CNPq, pela bolsa PIBIC concedida à Fabiana Santos da Silva.

## Literatura Citada

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Ed.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8. ed. Washington: ASM, 2003. p. 384-404.

IORIO, N. L. P.; FERREIRA, R. B. R.; SCHUENCK, R. P.; MALVAR, K. L.; BRILHANTE, A. P.; NUNES, A. P. F.; BASTOS, C. C. R.; SANTOS, K. R. N. Simplified and reliable scheme for species-level identification of *Staphylococcus* clinical isolates. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 8, p. 2564-2569, 2007.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa**

**Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 36-40, 2011a.

\_\_\_\_ ; \_\_\_\_ ; SILVA, F. S.; ALVIM, M. C. T.; REIS, D. R. L.; DOMINGUES, R. Identificação de estafilococos coagulase negativos isolados de mastite bovina por sequenciamento do rDNA 16S. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MICROBIOLOGIA, 26., 2011, Foz do Iguaçu. **Anais...** Sociedade Brasileira de Microbiologia, 2011b.1 CD.

TAPONEN, S.; SUPRÉ, K.; PIESSENS, V.; VAN COILLIE, E.; DE VliegHER, S.; KOORT, J. M. K. *Staphylococcus agnetis* sp. nov., a coagulase-variable species from bovine subclinical and mild clinical mastitis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 162-165, 2012.

THORBERG, B. M.; BRÄNDSTRÖM, B. Evaluation of two commercial systems and a new identification scheme based on solid substrates for identifying coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis. **Journal of Veterinary Medicine B**, v. 47, n. 9, p. 683-691, 2000.

# Poder de mercado das indústrias de laticínios no Brasil

## Market power of the dairy processors in Brazil

Marielli Cristina de Pinho<sup>1</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>2</sup>, Eduardo da Silva Mercês<sup>3</sup>, Kennya Beatriz Siqueira<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Economia – UFJF. Bolsista do CNPq. Email: e-ncal@cnpqgl.embrapa.br

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Gado de Leite . Email: marcos.hott@embrapa.br

<sup>3</sup> Estudante de Economia – UFJF. Bolsista do CNPq. Email: e-ncal2@cnpqgl.embrapa.br

<sup>4</sup> Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite. Email: kennya.siqueira@embrapa.br

**Resumo:** Nos últimos anos tem se observado grande número de fusões e aquisições no mercado lácteo, o que tem provocado mudanças no *ranking* das maiores indústrias de laticínios do País. Com isso, o volume de leite captado sob inspeção pelas indústrias brasileiras apresentou uma taxa de crescimento bastante relevante. O objetivo central desse artigo foi identificar o nível de concentração na captação de leite no Brasil. Para isso, foi utilizada a Razão de Concentração (CR), analisando-se a captação de leite das oito maiores processadoras de leite no Brasil. Os resultados indicaram que o mercado tem um baixo nível de concentração e poder de mercado, o que é bom para os produtores.

**Palavras-chave:** Captação de leite, mercado lácteo, razão de concentração.

**Abstract:** In the recent years, it is noticed some movements of fusions and acquisitions in the Brazilian dairy market, which is causing changes in the dairy processors ranking. Thus, the volume of milk delivery to the Brazilian dairy processors has increased considerably. The main objective of this paper is to identify the level of market concentration of dairy processors in Brazil. Using the Concentration Rate (CR), we analyzed the milk delivery of the eight largest dairy processors in Brazil. The results indicated that this market has a low level of market concentration and market power, which is good for the farmers.

**Keywords:** Market concentration, milk delivery, dairy market.

### Introdução

Nos últimos anos tem se observado grande número de fusões e aquisições no mercado lácteo, o que tem provocado mudanças no *ranking* das maiores indústrias de laticínios do País. Com isso, o volume de leite captado sob inspeção pelas indústrias brasileiras apresentou uma taxa de crescimento bastante relevante, em torno de 5,8% ao ano se considerarmos o período de 1999 a 2011.

Diante disso, acredita-se que é importante estudar o impacto dessas mudanças sobre o setor lácteo. Sendo assim, o objetivo central desse artigo é identificar o nível de concentração na captação de leite no Brasil. Especificamente, pretende-se examinar se realmente existe concentração no mercado de captação de leite brasileiro e se essa concentração se alterou no período de 1999 a 2011.

### Material e Métodos

O estudo da concentração de mercado é feito a partir dos índices de concentração, os quais pretendem fornecer um indicador sistêmico da concentração em determinado mercado, de modo a ser uma *proxy* para medir o poder de mercado das empresas e a influência que estas podem ter sobre ele, principalmente no quesito formação de preços (RESENDE e BOFF, 2002).

A metodologia empregada neste trabalho é a Razão de Concentração, indicador usado para se avaliar o percentual de participação das empresas no mercado. Foi analisado o *ranking* da captação anual das oito maiores indústrias de laticínios no período

de 1999 a 2011, tendo como fonte de pesquisa o levantamento anual da LEITE BRASIL e as bases de dados do IBGE.

A Razão de Concentração, conforme afirmam Resende e Boff (2002), é um índice que fornece a parcela de mercado das  $k$  maiores empresas e neste trabalho é dada pela equação:

$$CR(k) = \sum_{i=1}^k S_{i_n} \quad (1)$$

onde,  $S_i$  é a razão entre a captação de leite da empresa  $i$  e a captação total da indústria e  $k$  refere-se ao número de empresas estudadas no modelo, ( $k = 1, 2, \dots, n$ ). No nosso caso  $k = 8$ .

Este índice varia de 0 a 1, sendo que 0 seria um mercado onde as empresas analisadas não têm nenhum poder de mercado e 1 representa um mercado totalmente concentrado, onde as empresas analisadas dominam o mercado. Portanto, quanto maior o CR, maior a concentração da captação de leite das  $k$  maiores empresas.

## Resultados e Discussão

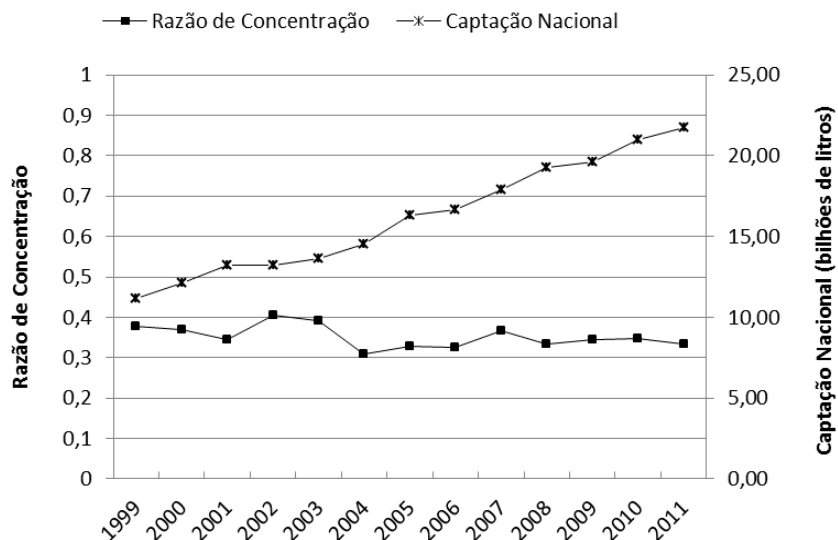
Na Tabela 1 a seguir encontra-se o valor de captação de leite das empresas que obtiveram os maiores resultados anuais, bem como a captação total de leite. É importante mencionar que nem todos os laticínios tornam seus dados públicos, o que pode influenciar neste *ranking* e também na medida da razão de concentração do mercado.

**Tabela 1.** *Ranking* anual de captação de leite sob inspeção no Brasil (em mil litros).

Empresas	1999	2000	2003	2005	2007	2009	2011
1º	797.000	941.490	1.500.179	1.708.000	1.800.000	2.050.000	2.125.000
2º	797.000	832.000	840.000	1.005.000	1.324.007	1.224.054	1.682.500
3º	772.699	832.000	750.000	841.549	1.090.000	1.125.000	1.100.000
4º	660.209	782.141	750.000	591.847	725.021	668.937	843.862
5º	418.591	488.131	671.780	360.124	632.735	470.021	494.432
6º	296.737	247.487	309.540	306.249	336.573	420.641	420.571
7º	231.001	225.659	261.230	268.268	333.490	398.590	303.093
8º	231.001	220.533	241.217	262.233	300.095	388.027	292.174
Captação Nacional	11.145.591	13.212.445	13.627.205	16.284.267	17.888.643	19.616.797	21.734.944

Fonte: Leite Brasil e IBGE.

Como pode-se observar pela Tabela 1, ocorreu um aumento muito expressivo na captação de leite no Brasil, de aproximadamente 95% em todo o período analisado, acompanhado também de um grande crescimento na captação individual das maiores empresas. A Figura 1 a seguir mostra os resultados obtidos a partir da aplicação do índice de concentração, plotado juntamente com a evolução da captação de leite nacional.



**Figura 1.** Razão de Concentração e captação nacional de leite (em bilhões de l) de 1999 a 2011.  
**Fonte:** resultados da pesquisa.

Pode-se observar pela figura que a taxa de concentração das 8 maiores empresas de laticínios do Brasil apresentou pouca variação, ficando relativamente estável entre 0,3 e 0,4 ao longo de todo o período analisado. Segundo Medeiros e Reis (1999), essa faixa de concentração significa baixa ou nenhuma concentração neste mercado.

Portanto, o resultado encontrado indica que o mercado, no geral, apresenta boa concorrência. Para o produtor, isso pode ser interpretado como fator positivo, indicando que existe competição pelo seu produto e o preço é definido pelo próprio mercado. Além disso, este resultado reflete um ponto positivo para o consumidor, que paga um preço mais justo e, além disso, tem uma gama maior de produtos nas prateleiras.

## Conclusões

O objetivo desse trabalho foi analisar a concentração na captação das indústrias de laticínios, usando o índice da razão de concentração. Dos resultados obtidos pode-se concluir que, ao contrário do que era esperado, num período de grandes transformações econômicas, a taxa de concentração na captação de leite se manteve num nível baixo e relativamente constante, com aumentos e decréscimos pouco significativos ao longo do período.

O baixo índice de concentração encontrado significa que existe diluição do poder de mercado das empresas e todos os agentes ganham com a concorrência. Mas é importante mencionar que concentração é diferente de igualdade na indústria. Apesar do baixo indicador resultante do modelo, o setor de captação possui aproximadamente 1.500 empresas atuantes, de modo que apenas 8 empresas detêm cerca de 35% da parcela do mercado, ou seja, pode-se concluir que a indústria de captação de leite no Brasil não apresenta concentração, mas também não é um setor igualitário. Além disso, vale ressaltar que o índice utilizado mede apenas a concentração total do mercado, não avaliando a distribuição geográfica dessas empresas. Assim, sugere-se que trabalhos posteriores incorporem fatores de localização espacial para determinar possíveis monopólios ou oligopólios regionais na captação de leite no Brasil.

## Agradecimentos

Ao CNPq



## **Literatura Citada**

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - SIDRA Disponível em:  
<<http://www.sidra.ibge.gov.br/>> . Acesso em: 03 abril 2012.

LEITE BRASIL – Associação Brasileira dos Produtores de leite. Disponível em:  
<<http://www.leitebrasil.org.br/>> . Acesso em: 03 abril 2012.

RESENDE, M.; BOFF, H. Concentração industrial. In: KUPFER, D.; HASENCLEVER, L.  
(Orgs.) **Economia Industrial**. Rio de Janeiro, RJ: Campus, 2002. p. 73 – 90.

# Estudo da competitividade do setor lácteo brasileiro

Eduardo da Silva Mercês<sup>1</sup>, Kennya Beatriz Siqueira<sup>3</sup>, Marielli Cristina de Pinho<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Estudante de Economia – UFJF. Bolsista do CNPq. Email: e-ncal2@cnpqgl.embrapa.br

<sup>2</sup> Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite. Email: kennya.siqueira@embrapa.br

<sup>3</sup> Estudante de Economia – UFJF. Bolsista do CNPq. Email: e-ncal@cnpqgl.embrapa.br

**Resumo:** Dado os acontecimentos recentes que a economia mundial vem sofrendo e a posição de destaque que o Brasil tem ocupado no cenário externo, torna-se oportuno analisar a competitividade de um importante setor da economia brasileira: a indústria do leite. Assim, sob a ótica da teoria da Vantagem Competitiva proposta por Michael Porter, Diamante da Competitividade, o presente artigo tem o objetivo de traçar um panorama da competitividade do setor lácteo brasileiro ao confrontar os dados desse segmento e os dados macroeconômicos brasileiros com dados internacionais. Após análise detalhada, chegou-se a conclusão de que o setor apesar de apresentar importantes fatores que favorecem a competitividade externa, ele também apresenta deficiências em alguns pontos essenciais e que se não tiverem as devidas atenções farão com que a indústria nacional perca espaço para outras indústrias emergentes como da Argentina e Uruguai.

**Palavras-chave:** competitividade, Diamante da Competitividade, mercado lácteo.

**Abstract:** Nowadays, Brazil has been noticed by international organizations because of its competitiveness improvements. So, it is important to analyze the competitiveness of a significant industry in Brazil: dairy. In order to analyze the Brazilian dairy industry competitiveness, we considered Porter's theory and worked with sector and macroeconomic data. As a result, we found that the Brazilian dairy industry has some competitive advantage, as its increasing consumption and production. However, Brazil has to work in some important weakness in order to gain more competitiveness.

**Keywords:** competitiveness, Diamond of Competitive Advantage, dairy industry.

## Introdução

Nos últimos anos, o Brasil ganhou muita importância no cenário econômico mundial. Com a crise das economias americana e europeia, o mundo passou a dar mais atenção aos mercados emergentes. Entre 2008 e 2012, muitas empresas brasileiras obtiveram melhor avaliação de competitividade por parte dos organismos internacionais. Neste contexto, é interessante analisar a competitividade de um setor de grande relevância no Brasil: o agronegócio do leite.

O Brasil sempre figurou entre os maiores produtores de leite do mundo. A atividade, atualmente, ocupa posição de destaque no cenário econômico nacional. De acordo com projeções da CNA (2012), este ano, o País deve produzir mais de 32 bilhões de litros de leite e, com isso, sua representatividade deve chegar a 19,51% na pecuária e 8,12% em todo o agronegócio brasileiro. Considerando o valor bruto da produção, o leite ocupa o 5º lugar entre as *commodities* agropecuárias produzidas no Brasil, perdendo apenas para carne bovina, cana-de-açúcar, soja e frango.

Sendo assim, torna-se oportuno avaliar a competitividade desse setor frente a outros países. Portanto, o foco central desse artigo é uma análise do ambiente em que o setor lácteo nacional está inserido com vistas a determinar o seu nível de competitividade internacional.

## Material e Métodos

Para o desenvolvimento deste trabalho foi utilizada a teoria da Vantagem Competitiva de Michael Porter, com foco no confronto dos dados do setor com os

determinantes do modelo do Diamante da Competitividade. Esse modelo relaciona quatro determinantes que modelam o ambiente no qual as empresas competem e que promovem ou impedem a criação da vantagem competitiva. Os quatro determinantes são: fatores de produção, fatores de demanda, empresas correlatas e de apoio e a administração e concorrência da indústria. O Diamante é um sistema mutuamente fortalecedor, onde cada determinante, e o conjunto deles como um todo, afeta o sucesso competitivo de uma nação (PORTER, 1989).

Foram analisados dados secundários de custos de produção, preço de leite e derivados, volume de produção, concentração da produção e da indústria, evolução do consumo *per capita* brasileiro e mundial, comércio internacional de lácteos, entre outros. Com isso, espera-se traçar um panorama da competitividade da indústria de laticínios brasileira em relação aos seus concorrentes externos.

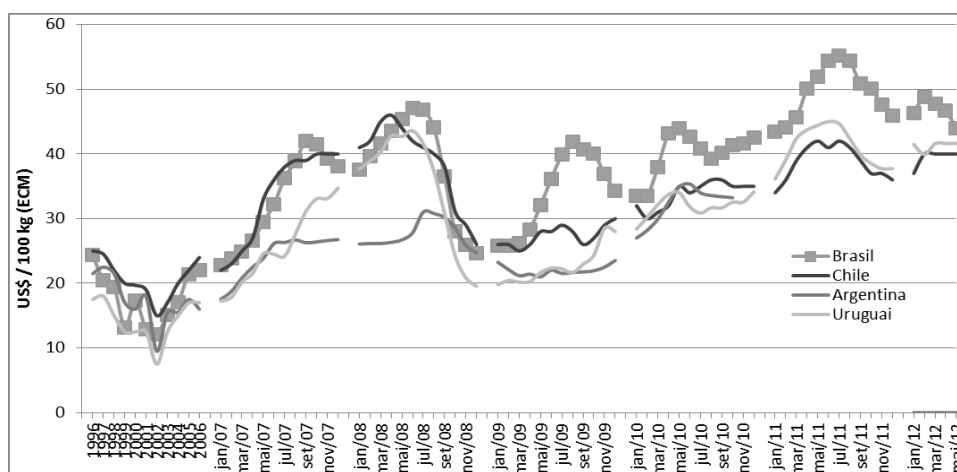
## **Resultados e Discussão**

O Brasil, atualmente é o 5º maior produtor de leite do mundo, atrás apenas de Estados Unidos, Índia, China e Rússia, com a produção estimada em 31,7 milhões de toneladas em 2010 (STOCK et al., 2011). A estrutura de produção de leite no Brasil é composta de um grande número de pequenos produtores que produzem em média até 10 litros de leite por dia e respondem por cerca de 4,6% da produção nacional. No entanto, eles representam cerca de 45% do total de produtores de leite do Brasil. No outro extremo, tem-se que 20,4% dos produtores com produção superior a 50 litros diários são responsáveis por mais de 74% do volume nacional produzido (STOCK et al., 2011). Com isso, a média de vacas por fazenda leiteira no Brasil gira em torno de 10 a 30 cabeças, enquanto que em lugares como Estados Unidos, Oceania e Argentina esse valor ultrapassa 100 cabeças.

A produção brasileira se concentra principalmente nas regiões sudeste, sul e no estado de Goiás onde também se localiza a maior parte das indústrias de laticínios. O estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, responsável por 27,3% de toda a produção nacional. O estado também apresenta uma taxa de crescimento da produção bastante elevada. Entre 2008 e 2010, Minas Gerais incrementou sua produção em 9,54%. Já a produção nacional, apresentou uma taxa média de crescimento de 4,4% entre 2000 e 2010, o que equivale a um incremento de 11,3 bilhões de litros no período (IBGE, 2012). A expectativa é de que esse volume continue a aumentar, pois só no primeiro trimestre de 2012 a captação foi 4,4% maior em relação ao primeiro trimestre de 2011, segundo IBGE (2012).

Esse crescimento da produção nacional pode ser explicado principalmente pelo aumento que o rebanho brasileiro sofreu nos últimos anos, pois o crescimento da produtividade não tem se mostrado muito significativo no País. Em 2010, segundo Stock et al. (2011), a produtividade brasileira estava em torno de 1,4 tonelada/vaca/ano, enquanto que em países como Estados Unidos e Alemanha girava em torno de 9,6 e 7,1 toneladas/vaca/ano.

Apesar de tanta disparidade entre a produtividade nacional e a de grandes *players* do mercado lácteo mundial, no que se refere a custos de produção de leite, o Brasil apresenta um custo médio muito próximo ao dos Estados Unidos, Oceania e Rússia, que, em 2009 girava em torno de 30 a 40 dólares por 100 kg (ECM) (HEMME et al., 2011). Apenas Europa e Canadá superavam os custos de produção do Brasil. Porém, nesses países, o governo oferece subsídios ao setor. Em relação aos principais países produtores da América do Sul, Argentina e Uruguai, estes apresentam um custo de produção menor que o brasileiro, com valores em torno de 20 a 30 dólares por 100 kg (ECM) (HEMME et al., 2011). Isso implica em preço final do leite mais barato, o que reduz a competitividade dos produtos nacionais frente a esses concorrentes. No entanto, vale ressaltar que estes custos estão cotados em dólar e, portanto, tem-se o efeito da taxa de câmbio sobre eles. Na Figura 1 pode-se visualizar as séries de preços do leite nos principais países sul-americanos.



**Figura 1.** Preço do leite nos principais produtores na América do Sul (em US\$/100 kg ECM).  
**Fonte:** Cepea/Inale/Odepa/Argentina.

De acordo com a Figura 1, o preço do leite no Brasil segue muito próximo aos preços da Argentina, Uruguai e Chile até o ano de 2008. Porém, em 2009, em decorrência dos efeitos da crise internacional, houve valorização da moeda brasileira frente ao dólar, que fez com que o preço do leite nacional se tornasse superior aos demais, dificultando, assim, as exportações e valorizando a importação.

Com relação ao comércio internacional, o Brasil apresentava *déficit* em sua balança comercial de lácteos, até o ano de 2004. A partir daí, com a economia em alta e o câmbio desvalorizado, a balança comercial de lácteos brasileira se tornou superavitária. Esse cenário prevaleceu até 2009, quando, sob efeito da crise e do câmbio valorizado, o País volta a se tornar deficitário. Com isso, as importações vêm aumentando de forma bastante significativa, principalmente da Argentina e Uruguai, obrigando o governo a interferir e tomar medidas para frear a entrada de produtos desses países. Do lado da exportação, o Brasil tem como principais consumidores externos países africanos, da América Latina e os Emirados Árabes (STOCK et al., 2011).

A produção e as importações crescentes vêm de encontro ao aumento gradual que o consumo de lácteos no Brasil vem apresentando recentemente. Em 2000, estimativas mostram que o consumo de leite no País estava em torno de 125 kg *per capita* ao ano, enquanto que em 2011 esse número passou para 170 kg. A tendência é que este crescimento continue a ocorrer à medida que a economia continue a crescer e a se desenvolver. Em países como os Estados Unidos e os da União Europeia, esse consumo ultrapassa os 250 kg *per capita* ao ano (STOCK et al., 2011). O aumento real da renda, a queda do desemprego, o aumento da taxa de escolaridade dos últimos anos, são fatores que mostram a boa fase que o País tem vivido e explicam o aumento do consumo dos produtos lácteos.

Porém, essa boa fase da economia tem apresentado um efeito perverso no campo. Um dos fatores que compõem os custos de produção do leite é a mão de obra, e esta tem se tornado cada vez mais cara devido ao aumento da taxa de escolaridade da população e à diminuição do índice de desemprego. A tendência é de que o trabalhador mais instruído busque emprego nas cidades, onde é mais bem remunerado. Assim, o produtor tem que aumentar os salários para tentar reter sua mão de obra. Esse é um problema que países como os Estados Unidos e Nova Zelândia já passaram e a solução que encontraram foi a mecanização da produção de leite, o que reduz a necessidade de um grande volume de trabalhadores, diminui as despesas e ainda aumenta a produtividade.

Após avaliar diversos fatores do segmento leiteiro nacional, torna-se importante analisar fatores externos ao setor, mas, que afetam o ambiente no qual as empresas estão instaladas e influenciam na competitividade dessas empresas. Para analisar estes fatores serão utilizados dados do *World Economic Forum* (WEF), o qual divulgou recentemente o "*The Global Competitiveness Report 2011-2012*", relatório em que avalia diversos fatores que influenciam de um modo geral a competitividade dos países. Segundo o WEF (2012), o Brasil ocupa a 53ª posição no *ranking* mundial de competitividade entre os 142 países

pesquisados. Ainda segundo o relatório, o Brasil se beneficia de muitos fatores, como o fato de ter um dos maiores mercados consumidores do mundo e grande sofisticação nos negócios, o que permite ganhos com economia de escala e escopo. Além disso, o País tem um dos mercados financeiros mais eficientes da América Latina e uma das maiores taxas de adoção de tecnologia e inovação (WEF, 2012).

Mas, por outro lado, o Brasil continua sofrendo algumas fraquezas que o impedem de ser mais competitivo. A falta de qualidade da infraestrutura geral, apesar de investimentos governamentais, como o PAC, os desequilíbrios macroeconômicos, a pobre qualidade global do sistema educacional, a rigidez do mercado de trabalho, e o progresso insuficiente para alcançar a competitividade são áreas de preocupação (WEF, 2012). Além disso, deve-se citar também a elevada taxa de juros do País, os impostos exagerados e a burocracia do governo.

## **Conclusões**

Através das análises, pode-se concluir que o Brasil possui diversos fatores favoráveis que o caracterizam como um grande competidor, como o crescente mercado interno e a crescente produção. No entanto, também há uma série de fatores que prejudicam o setor e que se não superados rapidamente e de forma eficiente, podem fazer com que a indústria perca espaço para outras emergentes como as da Argentina e Uruguai. Alguns dos principais problemas encontrados foram a taxa de câmbio e a mão de obra cara. Portanto, é necessário investir em ações pré-competitivas no setor, especialmente por parte das indústrias e ações governamentais para melhorar e aumentar os investimentos na indústria de laticínios e no próprio País. Só assim, será possível criar um ambiente mutuamente fortalecedor e que estimule a competitividade do agronegócio do leite brasileiro.

## **Agradecimentos**

Ao CNPq.

## **Literatura Citada**

CNA - CONFEDERAÇÃO NACIONAL DA AGRICULTURA. Disponível em: <<http://www.canaldoprodutor.com.br/>>. Acesso em: 22 jul. 2012.

HEMME, T.; Deeken, E.; Wesseling, K. **IFCN Dairy Report 2010**: for a better understanding of milk production world-wide. Kiel: Internacional Farm Comparison Network, Dairy Research Center, 2010.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Sistema de Recuperação de Informações – SIDRA**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 01 jul. 2012.

PORTER, M. **A vantagem competitiva das nações**. Rio de Janeiro, RJ: Campos, 1989. 520 p.

STOCK, L. A.; ZOCCAL, R.; CARVALHO, G. R.; SIQUEIRA, K B. **Competitividade do agronegócio do leite brasileiro**. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2011. 326 p.

WEF – World Economic Forum. The global competitiveness report 2011-2012. Disponível em: <[http://www3.weforum.org/docs/WEF\\_GCR\\_Report\\_2011-12.pdf](http://www3.weforum.org/docs/WEF_GCR_Report_2011-12.pdf)>. Acesso em 17 jun. 2012.

# **Viabilidade econômica da inserção de glicerina bruta na silagem de milho**

## **Effect on the performance of lactating cows, and the cost of feed for milk yield**

Vítor Lopes de Assis<sup>1</sup>, Jackson Silva e Oliveira<sup>3</sup>, Lorildo Aldo Stock<sup>2</sup>, Fernando C. Ferraz Lopes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estudante de Ciências Econômicas do Instituto Viana Júnior; bolsista de Iniciação Científica do Programa PIBIC Embrapa/CNPQ

<sup>2</sup>Analista da Embrapa Gado de leite

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** Em 2004 foi lançado no Brasil, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que consiste na inclusão de bicomcombustível no diesel de petróleo. Em função da produção do biodiesel, grande quantidade de glicerina tem sido gerada já que para cada 100 litros de biodiesel são produzidos, aproximadamente, 10 litros de glicerina bruta (GB) como coproduto do processo de transesterificação. A produção de biodiesel puro no Brasil foi de 52 milhões de litros em 2007. Com a obrigatoriedade da inclusão de 2% de biodiesel no diesel de petróleo a partir de 2008, e 11% a partir de 2013, a produção de biodiesel e, conseqüentemente, de GB aumentará substancialmente. Uma das alternativas é a utilização da GB como fonte de energia para alimentação de ruminantes. O glicerol, principal componente da GB, é altamente energético e se assemelha ao propilenoglicol, utilizado com eficiência na alimentação de vacas leiteiras de alta produção. Este trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade econômica da inclusão na dieta de vacas em lactação, da silagem de milho aditivada com diferentes níveis de glicerina bruta.

**Palavras-chave:** custo de produção, glicerina, leite, receita, viabilidade econômica.

**Abstract:** In 2004 was released in Brazil, the National Biodiesel Production and Use (NBPB), which is the inclusion of biofuel in diesel oil. Due to the recent development of technology for biodiesel production, large quantities of glycerin has been generated, for every 100 gallons of biodiesel are produced approximately 10 gallons of crude glycerin (GB) as a byproduct of the transesterification process. According to the NPA (National Petroleum Agency), the production of biodiesel in Brazil was approximately 52 million liters in 2007. With the requirement to include 2% biodiesel in diesel oil starting in 2008, and 11% in 2013, the biodiesel production will substantially increase the GB production. One of the alternatives is to use the GB source of energy for ruminants. Glycerol, the main component of the GB, is highly energetic and is similar to propylene glycol, used effectively in dairy cows of high production.

**Keywords:** economic viability, glycerin, income, milk, production cost.

## **Introdução**

Em 2004 foi lançado no Brasil, o Programa Nacional de Produção e Uso de Biodiesel (PNPB), que consiste na inclusão de bicomcombustível no diesel de petróleo. Em função do recente desenvolvimento da tecnologia para produção do biodiesel, grande quantidade de glicerina tem sido gerada já que para cada 100 litros de biodiesel são produzidos, aproximadamente, 10 litros de glicerina bruta (GB) como coproduto do processo de transesterificação. Segundo a ANP (Agência Nacional do Petróleo), a produção de biodiesel puro no Brasil foi de, aproximadamente, 52 milhões de litros em 2007. Com a obrigatoriedade de incluir 2% de biodiesel no diesel de petróleo a partir de 2008, e 11% a partir de 2013, a produção de biodiesel e, conseqüentemente, de GB aumentará substancialmente.

Este novo patamar de produção de glicerina, decorrente do PNPB, será muito superior à quantidade que atualmente pode ser absorvida e empregada comercialmente pelas indústrias química, farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Por isso, será necessário criar novas alternativas de utilização para este produto, visando minimizar potenciais impactos do excedente da produção e descarte da glicerina, principalmente no que se refere aos cuidados com o

ambiente, sobretudo porque o programa para produção de biodiesel não define, de forma clara e segura, o destino que deve ser dado aos subprodutos.

Uma das alternativas é utilizar a GB como fonte de energia para alimentação de ruminantes. O glicerol, principal componente da GB, é altamente energético e se assemelha ao propilenoglicol, utilizado com eficiência na alimentação de vacas leiteiras de alta produção. Um teste preliminar realizado na Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco, MG) mostrou que a adição de GB até o nível de 10% do peso verde da forragem de milho não compromete a qualidade nutricional da massa ensilada. Tais resultados motivaram o interesse para conhecer mais a respeito da possibilidade de uso da GB, como por exemplo, como aditivo para silagens e o efeito que essa adição pode ter sobre o desempenho de vacas em lactação. O trabalho teve como objetivo avaliar a viabilidade econômica da inclusão na dieta de vacas em lactação, da silagem de milho aditivada com diferentes níveis de glicerina bruta.

## Metodologia

O experimento foi realizado de agosto a outubro de 2011 na Embrapa Gado de Leite (Coronel Pacheco, MG), utilizando 12 vacas Holandês x Gir multíparas, com média de 55 dias de lactação, pesando e produzindo, em média, 458 kg e 20,7 kg/dia de leite, respectivamente. Foram avaliadas quatro dietas isoenergéticas e isoproteicas, compostas por silagem de milho concentrado à base de farelo de soja, fubá de milho e minerais. À silagem adicionou-se níveis de 0; 5; 10 e 15% de GB (base da matéria seca) no momento da ensilagem. As vacas foram confinadas em curral do tipo *free stall* com água *ad libitum*, sendo alimentadas individualmente em cochos equipados com portões eletrônicos do tipo *calan-gate*. As dietas foram fornecidas como mistura total (relação de 60% volumoso: 40% concentrado), sempre no início da manhã, de modo a permitir em torno de 10% de sobras.

Quatro silos experimentais, cada um com capacidade para oito toneladas (0,80 m x 0,60 m x 17 m) foram construídos e utilizados para preparar as quatro silagens experimentais. Foi utilizado delineamento Quadrado Latino 4 x 4, com duração de 21 dias, sendo os primeiros quatorze dias para adaptação e os sete restantes para coleta de amostras. Durante sete dias consecutivos de cada fase do QL foram coletadas amostras diárias de oferecido e sobras individuais para posterior determinação do consumo voluntário.

As vacas foram ordenhadas, mecanicamente, duas vezes ao dia (05:30 h e 15:00 h), e em cada fase do QL, foram realizados registros das produções de leite nos mesmos sete dias de mensuração do consumo de nutrientes. Em três dias consecutivos destes períodos, amostras individuais do leite das ordenhas da manhã (2/3) e da tarde (1/3) foram coletadas em frascos contendo bronopol® como conservante, e encaminhadas para o Laboratório de Qualidade do Leite da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), para determinação dos teores de proteína, gordura, extrato seco total e lactose.

Após a tabulação dos dados de produção de leite e da quantidade consumida de cada dieta, foi feita uma média aritmética simples para determinar o consumo e a produção em cada respectivo nível. Também foi feito um levantamento do preço dos produtos que fazem parte da dieta que foi usada no experimento. A partir dessas informações, foi realizado o estudo de viabilidade econômica de inserção de GB na silagem de milho.

## Resultados e Discussão

Os valores encontrados para os níveis de 0; 5; 10 e 15% de inclusão de GB na silagem mostraram que atualmente é inviável o seu uso devido ao grande aumento de custo pela inclusão de GB em cada um dos tratamentos, como mostra a Tabela 1.

**Tabela 1.** Custo médio de produção por vaca/dia.

Tratamento	0%	5%	10%	15%
Silagem de milho	2,59	3,39	3,70	4,08
Concentrado	8,10	9,02	10,04	9,69
Total	10,69	12,41	13,74	13,78

O custo de alimentação de uma vaca foi diretamente proporcional à medida que se aumentou o nível de adição de GB na silagem. O menor foi o tratamento sem a adição de GB (R\$ 10,69) como aditivo na silagem e o maior custo foi de R\$ 13,78 e refere-se ao tratamento com 15% de GB equivalente a um aumento de 57,52% no custo médio da silagem e de 28,90% no custo médio da alimentação. Isso ocorreu devido à grande diferença de preço existente entre a silagem pura e a glicerina, em que o preço da tonelada de GB pode ser até 8 vezes maior que o custo da silagem pura.

Outro dado importante que foi analisado refere-se à produção média de leite apresentada em cada tratamento, como mostra a tabela 2.

**Tabela 2.** Produção e composição média do leite.

Tratamento	Leite kg/dia	Gord (%)	Prot (%)	Lactose (%)	ESD (%)
0%	24,16	3,68	3,16	4,55	8,65
5%	24,78	3,60	3,08	4,56	8,57
10%	25,77	3,55	3,21	4,50	8,63
15%	25,30	3,35	3,26	4,61	8,82

O maior ganho na produção de leite (6,6%) ocorreu no tratamento de 10% de adição de GB. Apesar de ter a maior quantidade de GB, o tratamento de 15% teve produção inferior ao do tratamento de 10%. A Tabela 3 mostra os dados de consumo médio de matéria natural de cada tratamento.

**Tabela 3.** Consumo médio de matéria natural.

Tratamento	0%	5%	10%	15%
Silagem de milho	37,87	38,43	31,37	29,25
Concentrado	7,79	8,6	9,43	9,1
Total	45,66	47,03	40,80	38,35

Quanto maior a quantidade de GB na silagem de milho, menor foi seu consumo, chegando a ser 22,7% menor no tratamento IV (15%). O contrário ocorreu no consumo de concentrado, que foi 16,81% maior no tratamento com maior nível de GB na silagem.

Todavia, os resultados deste estudo não esgotam o assunto. Há evidências de que o uso da GB para a alimentação animal pode apresentar-se viável considerando pelo menos dois pontos.

O primeiro refere-se ao fato de que atualmente (2012) o preço da GB está, por assim dizer, com preço atípico, bastante acima do preço médio histórico. Se a hipótese de um maior incentivo à produção de biodiesel vier a se realizar, tudo indica que a produção de GB será significativamente maior em volume, que poderá vir a ocasionar uma queda de seu preço no futuro.

O segundo, levando-se em conta um estudo realizado por ASSIS (2011) mostra que a GB pode ser importante como substituto parcial do fubá de milho na dieta das vacas, dependendo da relação de preços milho/GB.

## Conclusões

Apesar dos ganhos em produção e do menor consumo de silagem no decorrer dos tratamentos, os valores encontrados comprovam que atualmente não é viável inserir a glicerina bruta na silagem, como fonte de energia, para a alimentação de vacas em lactação, em vista do atual preço da GB estar muito acima do custo da silagem bruta. Caso a relação de preço silagem/glicerina venha a melhorar, então sua possibilidade de uso como aditivo na silagem pode vir a se tornar viável para os produtores de leite.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de Iniciação Científica.



## **Literatura Citada**

ASSIS, V.L. et al. **Viabilidade econômica da inclusão da glicerina bruta oriunda da produção de biodiesel em dietas de vacas em lactação.** In: IX Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora. Juiz de Fora, 2011.

BARROSO, D.S.; ALMEIDA, V.V.S.; SILVA, R.R. et al. Níveis crescentes de glicerina bruta na dieta de novilhas suplementadas a pasto: comportamento ingestivo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 47., 2010, Salvador. **Anais...** Salvador: SBZ, 2010. 1 CD-ROM.

SAN VITO, E. **Glicerina bruta na alimentação de vacas leiteiras.** 2010. 40p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Viçosa, 2010.

ZACARONI, O.F. **Resposta de vacas leiteiras à substituição de milho por glicerina bruta,** 2010. 43p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010

# Seleção de progênies de *Brachiaria ruziziensis* para qualidade de forragem<sup>1</sup>

## Selection of progenies of *Brachiaria ruziziensis* for forage quality

Anna Carolina Pereira Staico<sup>2</sup>, Karoliny Nagib de Sales<sup>2</sup>, Fabiana Camarinha<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>3</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>3</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>3</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Trabalho parcialmente financiado com recursos do CNPq e Fapemig

<sup>2</sup> Bolsista de iniciação científica e estudante do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior (CES) de Juiz de Fora. E-mail: carol\_staico@hotmail.com; karolsales\_\_@hotmail.com; fabycamarinha@hotmail.com

<sup>3</sup> Embrapa Gado de Leite. E-mail: flavio.benites@embrapa.br; juarez.machado@embrapa.br; francisco.ledo@embrapa.br; fausto.souza@embrapa.br

**Resumo:** Na utilização das pastagens como principal fonte de alimento para os rebanhos, as espécies de *Brachiaria* ocupam as maiores áreas. Os bovinos precisam de uma alimentação que atenda todos os seus requisitos nutricionais para obterem uma boa produção e qualidade de leite. O objetivo desse trabalho foi avaliar progênies de *B. ruziziensis* visando a seleção para melhoria da qualidade de forragem produzida. Foram avaliadas 46 progênies de meio-irmãos de *B. ruziziensis*, utilizando o delineamento de blocos aumentados. As amostras de forragem foram coletadas com 30 dias de crescimento das plantas. Existe variação para características relacionadas à qualidade da forragem dentro de *B. ruziziensis*. Observaram-se diferenças significativas entre porcentagens de celulose (CEL), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS), fibra em detergente ácido (FDA) e neutro (FDN), lignina (LIG), e de proteína bruta (PB). É possível identificar materiais genéticos de *B. ruziziensis* com melhor qualidade da forragem comparada às principais cultivares disponíveis no mercado atualmente.

**Palavras-chave:** Alimentação animal, melhoramento de forrageiras, qualidade nutricional.

**Abstract:** In the use of pasture as the main source of food for livestock, the *Brachiaria* species occupy the major areas. Cattle need a diet that meets all their nutritional requirements to obtain a good yield and quality of milk. For this, the aim of this study was to evaluate progenies of *B. ruziziensis* in order to select for improved quality of forage produced. We evaluated 46 different half-brothers of *B. ruziziensis*, using the augmented block design. Forage samples were collected with 30 days of plant growth. There is variation for traits related to forage quality in *B. ruziziensis*. We observed significant differences between percentages of cellulose, *in vitro* digestibility of dry matter (DM), acid detergent fiber (ADF) and neutral (NDF), lignin, and crude protein (CP). It is possible to identify genetic material of *B. ruziziensis* with improved forage quality compared to the main cultivars available today.

**Key-words:** Animal nutrition, improvement of forage, nutritional quality.

## Introdução

A pecuária no Brasil tem como base pastagens de gramíneas, que são a principal fonte de alimentação do rebanho, responsável por quase 90% da carne bovina e pela maior parte do leite produzido no país (SOUZA SOBRINHO et al., 2009; PEREIRA et al., 2001). Aproximadamente 85% das áreas de pastagens cultivadas no país são ocupadas por espécies do gênero *Brachiaria* (MACEDO, 2005). Dentre elas, destacam-se as espécies *B. decumbens* por causa da boa adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade; *B. brizantha* com resistência à cigarrinha-das-pastagens; *B. ruziziensis* com alto valor nutritivo e *B. humidicola* com boa adaptação a solos ácidos, de baixa fertilidade e mal drenados (VALLE; MILES, 1994).

As carências nutricionais são os principais responsáveis pelo baixo índice de produtividade dos rebanhos brasileiros. Por isso, é indispensável uma alimentação adequada para que os animais possam expressar todo o seu potencial produtivo. O objetivo desse trabalho foi

avaliar progênies de *B. ruziziensis* visando a seleção para melhoria da qualidade de forragem produzida.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco-MG. Foram avaliadas progênies de meio-irmãos de *B. ruziziensis* oriundos do programa de melhoramento conduzido pela Embrapa Gado de Leite.

Foram avaliadas 46 progênies em delineamento de blocos aumentados. Como testemunhas comuns foram utilizadas as cultivares Basilisk (*B. decumbens*), Marandu (*B. brizantha*) e Kennedy (*B. ruziziensis*). As parcelas experimentais foram constituídas de quatro linhas de 2 m de comprimento, com espaçamento de 0,8 m entre linhas e 0,5 m entre plantas.

As sementes dos diferentes tratamentos foram semeadas em caixas plásticas (60 x 38 x 15 cm) contendo substrato comercial. As plântulas foram transplantadas para tubetes plásticos (35 cm<sup>3</sup>) acondicionados em bandejas plásticas mantidas em casa de vegetação. Aproximadamente 40 dias depois foi realizado o plantio das mudas no campo. O corte de uniformização foi realizado 45 dias após o plantio, sucedendo-se cortes de avaliação com intervalos de crescimento de 30 dias. A altura dos cortes foi de 10 cm em relação ao solo. Em um corte realizado em época representativa da estação das águas foram retiradas amostras de forragem para realização de análises bromatológicas. As amostras foram separadas em caules e folhas, secadas em estufa de ventilação forçada (55<sup>a</sup> por 72 horas), moídas a 1mm e encaminhadas ao laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG). Nas amostras das folhas procedeu-se, então, a avaliação de características relacionadas à qualidade da forragem: porcentagens de proteína bruta (PB), lignina (LIG), celulose (CEL), fibra em detergente neutro (FDN) e ácido (FDA) e digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS). Essas características foram analisadas por meio de equipamento de espectrofotômetro próximo do infravermelho (NIR's).

As informações de cada uma das variáveis foram submetidas às análises estatísticas empregando-se o programa Genes (CRUZ, 2001). As médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Scott-Knott ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Foram detectadas diferenças significativas entre os clones, indicando a existência de variabilidade para as características bromatológicas da forragem dentro de *B. ruziziensis*. Resultados semelhantes foram observados por Souza (2010) trabalhando com clones e progênies de meio-irmãos de *B. ruziziensis*.

De modo geral, observou-se variação entre as médias das progênies para todas as características avaliadas, sendo que alguns destes genótipos apresentaram-se superiores às testemunhas, que são cultivares comerciais de uso bastante disseminado em todo o país (Tabela 1). Este resultado evidencia a possibilidade de seleção de genótipos de *B. ruziziensis* com melhor qualidade forrageira do que as cultivares comerciais disponíveis atualmente.

**Tabela 1.** Médias ajustadas dos 10 clones que obtiveram os melhores resultados, os 5 piores e as 3 testemunhas, para as porcentagens de celulose (CEL), digestibilidade (DIVMS), fibra em detergente ácido (FDA), fibra em detergente neutro (FDN), lignina (LIG) e proteína bruta.

Clone	CEL	Clone	DIVMS	Clone	FDA	Clone	FDN	Clone	LIG	Clone	PB
6	21,2	42	75,4	6	25,4	7	54,7	13	3,9	41	22
1	22,8	35	75,4	1	25,6	6	54,8	4	4	15	21,6
16	23	41	75,3	3	27,1	1	55,2	29	4	16	21
7	23,3	19	74,5	16	27,2	9	55,4	3	4,2	24	20,8
35	23,9	2	73,3	7	27,5	35	55,8	14	4,2	43	20,8
17	24	40	73,2	17	27,5	3	55,9	6	4,3	40	20,7
9	24	36	72,6	19	27,9	2	56,1	34	4,5	39	20,6
3	24,1	43	72,5	27	27,9	16	56,4	36	4,6	11	20,4
13	24,2	15	72,5	13	27,9	13	57,6	27	4,7	26	20,3
4	24,3	23	72,5	4	28,1	4	57,6	31	4,7	18	20,3
30	27,3	5	68	14	31,9	31	61,7	40	6	6	17
18	27,6	18	67,7	34	32	18	61,9	38	6,1	34	16,9
34	27,7	27	67,3	32	32,1	20	62,1	41	6,2	3	16,4
14	28,5	14	67,2	37	32,2	14	62,3	15	6,3	14	15,8
36	29,8	20	66	36	33	36	64,8	18	6,3	4	13,9
<i>Brizantha</i>	28,1		70,5		32,3		62,4		5,4		18,5
<i>Decumbens</i>	27,2		68		31,1		61,7		4,9		18
<i>Ruziziensis</i>	24,6		71,6		28,8		58,6		5,1		20

A digestibilidade da matéria seca da forragem apresentou amplitude entre as médias de 9,5 pontos percentuais, tendo as progênes 42 e 35 (75,5%) como as melhores e a 20 (66%) como a pior.

Segundo Soest (1994), a análise de FDA representa uma estimativa do teor total de celulose e lignina da amostra, sendo inversamente relacionada com a digestibilidade. Assim, os menores valores de FDA indicam a presença de menor concentração de lignina na parede celular e, portanto, maior digestibilidade (SOEST, 1994). Verifica-se, portanto, que, para essa característica, a progênie 6 apresentou melhor desempenho, com média de 25,4% de FDA (Tabela 1).

A porcentagem de fibra de detergente neutro (FDN) das folhas das plantas, a amplitude total foi de 10,1%. O clone 7 apresenta melhor desempenho de FDN, 54,7%, e o clone 36 o pior, com 64,8%. A análise de FDN estima a concentração total de celulose, hemicelulose e lignina da parede celular. Sendo o FDN inversamente relacionado com a capacidade de consumo de matéria seca, o que significa que quanto menor for esse valor, maior será a expectativa de consumo (LEÃO, 2009).

Quanto a porcentagem de proteína bruta das folhas verificou-se uma amplitude total de 8,1%, com o clone 41(22%) apresentando o melhor desempenho, e o 4 (13%) como o pior.

Entre as testemunhas, a *B. brizantha* apresentou os mais elevados teores de FDA, FDN, celulose e lignina, que são classificados como ruins. A *B. decumbens* apresentou a pior digestibilidade. Já a *B. ruziziensis* se destacou quanto à qualidade da forragem, apresentando a melhor digestibilidade entre testemunhas utilizadas, confirmando resultados da literatura (SOUZA SOBRINHO et al., 2009).

## Conclusões

Existe variação para características relacionadas à qualidade da forragem dentro de *B. ruziziensis*.

É possível identificar materiais genéticos de *B. ruziziensis* com melhor qualidade da forragem comparada às principais cultivares disponíveis no mercado atualmente.

## Agradecimentos

A CNPq

## Literatura Citada

CRUZ C. D. **Programa GENES** – Versão Windows, aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2001. 648 p.

LEÃO, F. F. **Citogenética e potencial forrageiro de combinações genômicas de capim-elefante e milho**, 2009. 106 f. (Tese Doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas). UFLA, Lavras, 2009.

PEREIRA, A. V.; VALLE, C. B.; FERREIRA, R. P.; MILES, J. W. Melhoramento de forrageiras tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARESINGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento de plantas**. Cuiabá: Fundação Mato Grosso, 2001. p. 549-602

SOUZA SOBRINHO, F.; CARNEIRO, H.; LÉDO, F. J. S.; SOUZA, F. F. Produtividade e qualidade da forragem de *Brachiaria* na Região Norte Fluminense. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**, v. 2, n. 3, p. 7-12, 2009.

SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F. J. S.; KOPP, M. M.; PEREIRA, A.V.; SOUZA, F. F. Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite. In: Evangelista, A. R.; Souza, F. F. (Eds.). **Forragicultura e Pastagem**. Lavras: UFLA, 2009. p. 98-111.

SOUZA, F. F. **Produção, qualidade e estimativas de parâmetros genéticos em *Brachiaria ruziziensis*** Germain et Everard, 2010. 205 f. (Tese Doutorado em Zootecnia). UFLA, Lavras, 2010.

**Impacto do aumento da concentração de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) na duração e sobrevivência ninfal de *Mahanarva spectabilis* (DISTANT, 1909) (Hemiptera: Cercopidae)**

**Effect of elevated levels CO<sub>2</sub> in duration and survival nymphal of *Mahanarva spectabilis* (DISTANT, 1909) (Hemiptera: Cercopidae)**

Ítalo Salvatore de Castro Pecci Maddalena<sup>1</sup>, Alexander Machado Auad<sup>2</sup>, Marcy das Graças Fonseca<sup>3</sup>, Tiago Teixeira de Resende<sup>4</sup>, Thiago Henrique Fazza dos Santos<sup>1</sup>, Tamires Moreira Vieira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estagiário do laboratório de Entomologia da Embrapa Gado de Leite. E-mail: [italopecci@yahoo.com.br](mailto:italopecci@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup>Pós-doutoranda do CNPq

<sup>4</sup>Bolsista de apoio técnico do CNPq

**Resumo:** Objetivou-se avaliar a duração e sobrevivência ninfal de *M. spectabilis* quando mantidas em altas concentrações de CO<sub>2</sub>. Ovos de *M. spectabilis* próximos a eclosão foram colocados em torno da raiz de capim-elefante cv. Roxo de Botucatu, plantado em vaso de 500 mL. Estes vasos foram mantidos em câmara climática com CO<sub>2</sub> constante a 700 ppm (20 repetições) ou oscilante (média de 448 ppm) (20 repetições). As câmaras climatizadas com CO<sub>2</sub> constante e oscilante foram mantidas a 25 °C ± 2 °C, 70% ± 10% de UR e fotofase de 14 h. Após 20 dias, foram realizadas observações diárias para registrar a duração e sobrevivência da fase ninfal de *M. spectabilis*. Não houve diferença significativa na duração da fase ninfal de *M. spectabilis* quando mantidas a CO<sub>2</sub> constante (700 ppm) e oscilante (média de 448 ppm). A duração média ninfal (41 dias) registrada no presente estudo, foi similar àquelas mencionadas na literatura, em que *M. spectabilis* foram mantidas em níveis de CO<sub>2</sub> atual. Em adição, a porcentagem de sobrevivência ninfal foi significativamente igual quando mantidas nos dois ambientes. Vale ressaltar que, em ambos os ambientes, a sobrevivência ninfal foi próxima a 17%, sendo provável que outros fatores possam ter influenciado a alta mortalidade, como por exemplo, a qualidade nutricional da planta, a qual foi submetida a diferentes níveis de CO<sub>2</sub>. Com esses resultados, ficou evidente que o efeito isolado das concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> não acarretou aumento na duração e sobrevivência das ninfas de *M. spectabilis*.

**Palavras-chave:** cigarrinha-das-pastagens, forrageira, mudanças climáticas.

**Abstract:** The objective of this study was to evaluate the duration and nymphal survival of *M. spectabilis* when kept in high CO<sub>2</sub> concentrations. Eggs of *M. spectabilis*, near eclosion, were placed around the root of elephant grass Roxo de Botucatu cv., planted in pots of 500 mL. These pots were kept under a constant high CO<sub>2</sub> environment (700 ppm) (n = 20) or under fluctuating CO<sub>2</sub> levels (average of 448 ppm) (n = 20). The climatic chamber with constant and oscillating CO<sub>2</sub> were maintained at 25 °C ± 2 °C, 70% ± 10% RH and 14 h photophase. After 20 days, observations were made daily to record the duration and viability of the nymphal stage of *M. spectabilis*. There was no significant difference in the duration of the nymphal stage of *M. spectabilis* when kept at constant CO<sub>2</sub> (700 ppm) and oscillating (average 448 ppm). The average of nymphal duration (41 days) recorded in this study were similar to those mentioned in the literature, in which *M. spectabilis* were maintained under a CO<sub>2</sub> current levels. Moreover, the percentage of nymphal survival was significantly the same in both environments. It is noteworthy that in both environments, the nymphs survival was close to 17%, it is likely that other factors may have influenced the high mortality, such as the nutritional quality of plant, which was subject to different levels of CO<sub>2</sub>. Based on these results, we concluded that the isolated effect of elevated CO<sub>2</sub> concentrations did not affect the duration and survival of nymphs of *M. spectabilis*.

**Keywords:** spittlebug, forage, climate change.

## Introdução

Os níveis de CO<sub>2</sub> atmosférico têm aumentado desde o início da revolução industrial e estima-se que estes possam ser superiores a 700 ppm até 2100 (IPCC, 2007). Muitos trabalhos tem sido realizados com o intuito de conhecer as possíveis implicações que as mudanças climáticas globais, podem acarretar sobre diferentes ecossistemas e organismos (KARBAN & STRAUSS, 2004; YIN et al., 2010; AUAD et al., 2012). O aumento da concentração de dióxido de carbono pode influenciar o desenvolvimento de insetos herbívoros direta ou indiretamente, através do efeito que o ambiente enriquecido com CO<sub>2</sub> pode ocasionar, sobre plantas hospedeiras (YIN et al, 2010).

A cigarrinha-das-pastagens *Mahanarva spectabilis* (DISTANT, 1909) (Hemiptera: Cercopidae) é considerada praga limitante na produção de gramíneas forrageiras (Auad et al., 2007). Todavia necessita-se de estudos que avaliem os impactos da elevação do dióxido de carbono nos aspectos biológicos deste inseto, a fim de conhecer a atuação do mesmo em um cenário futuro, no qual estima-se elevados níveis de CO<sub>2</sub>. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a duração e sobrevivência ninfal de *M. spectabilis* quando mantidas em altas concentrações de CO<sub>2</sub>.

## Material e Métodos

Adultos de *M. spectabilis*, provenientes da criação de cigarrinhas da Embrapa Gado de Leite, foram levados para o laboratório, sexados e mantidos em gaiolas cilíndricas de plástico transparente (50 cm de altura x 10 cm de diâmetro). Em cada gaiola foi colocada uma planta de capim-elefante com a base envolvida com gaze umedecida em água destilada, que serviu de substrato para oviposição. Para a retirada dos ovos retidos no substrato, a gaze foi colocada sobre um conjunto de peneiras e submetido à água corrente, tendo os ovos, ficado retidos naquela mais fina (400 mesh de abertura). Em seguida, os ovos foram colocados em placas de petri (5 cm de diâmetro) forradas com papel-filtro e mantidas em câmara climatizada 28 °C ± 2 °C, 70% ± 10% de UR e fotofase de 14 h, até próximo a eclosão. Dez ovos foram colocados em torno da raiz de plantas de capim-elefante cv. Roxo de Botucatu, cultivados em vasos de 500 mL, sendo estes tampados para impedir a fuga das ninfas. Os tratamentos consistiram em vasos mantidos em câmara climática (fitotron) com CO<sub>2</sub> constante a 700 ppm (20 repetições) e câmara climática (fitotron) com CO<sub>2</sub> oscilante (média de 448 ppm) (20 repetições). O delineamento experimental foi inteiramente casualizado. As câmaras climatizadas com CO<sub>2</sub> constante e oscilante (2,5 x 2,20 x 2,80 m) foram mantidas a 25 °C ± 2 °C, 70% ± 10% de UR e fotofase de 14h. Após 20 dias, foram realizadas observações diárias para registrar a duração e sobrevivência da fase ninfal de *M. spectabilis*. Os dados foram submetidos à análise de variância.

## Resultados e Discussão

Não houve diferença significativa na duração da fase ninfal de *M. spectabilis* quando mantidas a CO<sub>2</sub> constante (700 ppm) e oscilante (média de 448 ppm) (Tabela 1). A duração média ninfal (41 dias) registrada no presente estudo, foi similar àquelas mencionadas na literatura (AUAD et al., 2007), em que *M. spectabilis* foram mantidas em níveis de CO<sub>2</sub> atual. Em adição, a porcentagem de sobrevivência ninfal bem como a viabilidade dos ovos foi significativamente igual quando mantidas nos dois ambientes (Tabela 1). Semelhante a estes resultados, (FERREIRA et al., 2012) não observaram diferença significativa na sobrevivência ninfal de *M. spectabilis* quando mantidas a CO<sub>2</sub> constante (500 ppm) e oscilante (média de 368 ppm), porém menor sobrevivência das ninfas foi constatada para aquelas mantidas a um nível de CO<sub>2</sub> baixo e constante (250 ppm). Yin et al (2010) também não observaram diferença significativa na duração do ciclo

de vida de *Helicoverpa armigera* Hubner (Lepidoptera: Noctuidae) submetida à índices elevados de CO<sub>2</sub>, sugerindo que não houve efeito direto do CO<sub>2</sub> sobre os aspectos biológicos dos insetos avaliados.

Vale ressaltar que, em ambos os ambientes, a sobrevivência ninfal foi baixa (Tabela 1), sendo provável que outros fatores possam ter influenciado a alta mortalidade, como por exemplo, a qualidade nutricional da planta, a qual foi submetida a diferentes níveis de CO<sub>2</sub>. O efeito da qualidade nutricional das plantas e conseqüentemente no ciclo de vida de afídeos (AUAD et al., 2012) e cigarrinha das pastagens (FERREIRA et al., 2012) foi relatado. Sendo assim, ressalta-se que o efeito nos parâmetros biológicos nos insetos herbívoros é variável, e de acordo com o presente estudo pode-se inferir que independente dos níveis de CO<sub>2</sub> serem mantidos altos e constantes ou oscilantes a duração e sobrevivência de *M. spectabilis* não foram afetadas.

**Tabela 1.** Duração e sobrevivência ninfal de *M. spectabilis* quando mantidas em ambientes com diferentes concentrações de CO<sub>2</sub>.

Tratamento	Duração	Sobrevivência (%)	
		Ovos	Ninfas
Fitotron CO <sub>2</sub> constante (700 ppm)	42,27	94,0	17,00
	n = 20	n = 20	n = 20
Fitotron CO <sub>2</sub> oscilante (média de 448 ppm)	40,16	99,4	15,00
	n = 20	n = 20	n = 20

\*Médias comparadas nas colunas, não diferiram entre si, pela análise de variância.

## Conclusões

O efeito isolado das concentrações elevadas de CO<sub>2</sub> não acarretou variação na duração e sobrevivência das ninfas de *M. spectabilis*.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig.

## Literatura Citada

AUAD, A. M., FONSECA, M. G., RESENDE, T. T.; MADDALENA, I. S. C. P. Effect of Climate Change on Longevity and Reproduction of *Sipha flava* (Hemiptera: Aphididae). *Florida Entomologist*, v. 95, p. 433-444, 2012.

AUAD, A. M., SIMOES, A. D., PEREIRA, A. V., BRAGA, A. L. F., SOBRINHO, F. S., LEDO, F. J. D., PAULA-MORAES, S. V., OLIVEIRA, S. A.; FERREIRA, R. B. Selection of elephant grass genotypes for resistance to spittlebug. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, v. 42, p. 1077-1081, 2007.

FERREIRA, R. B., MORAES, J. C., AUAD, A. M.; FONSECA, M. G. Interaction of spittlebug and forage grass under different carbon dioxide concentrations. *Journal of Pest Science*, 2012.

SOLOMON, S.; QIN, D.; MANNING, M.; CHEN, Z.; MARQUIS, M.; AVERYT, K. B.; TIGNOR, M.; MILLER, H. L. (eds.). **Contribution of Working Group I of the Intergovernmental Panel on Climate Change**. Cambridge: Cambridge Univer Press, 2007. p. 996.



KARBAN, R.; STRAUSS, S. Y. Physiological tolerance, climate change, and a northward range shift in the spittlebug, *Philaenus spumarius*. **Ecological Entomology**, v. 29, p. 251-254, 2004.

YIN, J., SUN, Y. C., WU, G.; GE, F. Effects of elevated CO<sub>2</sub> associated with maize on multiple generations of the cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, v. 136, p. 12-20, 2010.

# Uso de vetores lentivirais para a produção de embriões transgênicos bovinos

Fernanda Bernardes Eugênio de Paula<sup>1,4</sup>, Eliza Diniz de Souza<sup>2</sup>, Rafael José Otero Arroyo<sup>3</sup>, Thamiris Dornelas de Araújo<sup>4</sup>, Gabriela Nardy Quinelato<sup>5</sup>, Lilian Tamy Iguma<sup>2</sup>, Luiz Sergio de Almeida Camargo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsita PIBIC, aluna do CES – JF.

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa, MG

<sup>4</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, MG

<sup>5</sup>Universidade Presidente Antônio Carlos, Unipac, Juiz de Fora, MG

**Resumo:** Um obstáculo para a produção de animal doméstico geneticamente modificado é o estabelecimento de um sistema mais eficaz na geração de embriões que permita a expressão do transgene. O objetivo do presente trabalho foi avaliar um sistema de produção de embriões transgênicos por meio de microinjeção de vetores lentivirais em oócitos bovinos. Oócitos maturados in vitro foram divididos aleatoriamente em dois grupos: grupo controle (GC) – oócitos sem microinjeção de vetores lentivirais e grupo microinjetado (GM) – oócitos microinjetados com solução contendo vetores lentivirais carreando o transgene da proteína verde fluorescente (GFP). Avaliou-se a taxa de clivagem e de blastocistos e os dados foram analisados por ANOVA. Não houve diferença na taxa de clivagem e de blastocistos entre os grupos. No GM foram produzidos 28,5% de embriões expressando o transgene GFP e nenhum embrião transgênico foi produzido no GC. Conclui-se que o procedimento de microinjeção dos vetores lentivirais é capaz de produzir embriões transgênicos.

**Palavras-chave:** Microinjeção, Transgenia animal, Vetor lentiviral.

**Abstract:** One obstacle for production of transgenic domestic animal is the establishment of more efficient system for generation of embryos that allows the expression of the transgene. The objective of this study was to evaluate the production of transgenic embryos by microinjection of lentiviral vectors in bovine oocytes. In vitro matured oocytes were randomly divided into two groups: control group (GC) - oocytes with no microinjection of lentiviral vectors and microinjected group (GM) - oocytes microinjected with a solution containing the lentiviral vectors carrying the transgene for green fluorescent protein (GFP). Cleavage and blastocyst rate were evaluated and data were analyzed by ANOVA. There was no difference in cleavage rate and blastocyst rate between groups. In the GM was produced 28.5% of embryos expressing GFP transgene and no transgenic embryo was produced in the GC. In conclusion, microinjection of lentiviral vectors is able to produce transgenic bovine embryos.

**Keywords:** Microinjection, transgenic animal, lentiviral vector.

## Introdução

A geração de animais geneticamente modificados (AGM) possibilita o estudo de doenças humanas e a produção de biofármacos, desta forma, o desenvolvimento e aprimoramento de tecnologias para modificar o genoma animal tem sido de grande importância. A transgenia pode ser útil em bovinos para a geração de animais resistentes a doenças ou que produzam alimentos de melhor qualidade, através de melhorias na composição do produto ou do menor uso de medicamentos.

As alternativas para gerar embriões transgênicos de animais de produção, principalmente ruminantes, tem sido poucos eficientes. A técnica de microinjeção pronuclear do transgene, por exemplo, é utilizada desde a década de 80, no entanto, sua eficiência é baixa (revisto por MOISYADI *et al.*, 2009). Uma alternativa para modificar embriões geneticamente é a utilização de vetores lentivirais. Este método tem apresentado alta eficiência na geração de murinos e suínos nascidos transgênicos (PARK, 2007). Em bovinos, conseguiu-se obter elevada taxa de

embriões transgênicos, com nascimento, sendo todos os nascidos modificados com gene GFP (HOFMANN *et al.*, 2004).

Os lentivírus pertencem à família Retroviridae e compreende vírus que utilizam a RNA-dependente-DNA-polimerase, ou seja, uma transcriptase reversa (TR) (COFFIN *et al.*, 1997). Esta propriedade dos lentivírus resulta na integração permanente da transgene no cromossomo do hospedeiro (MOFFAT *et al.*, 2006). Os retrovírus são os mais apropriados para uma transformação estável de células de mamífero, pois o DNA viral é eficientemente integrado no genoma hospedeiro e não ocasiona a lise celular (WATSON, 1992). Os vetores lentivirais exigem a micromanipulação dos oócitos para a injeção no espaço perivitelino, uma vez que não atravessam a zona pelúcida.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a produção de embriões transgênicos por meio de microinjeção de vetores lentivirais no espaço perivitelino de oócitos bovinos.

## Material e Métodos

Foram utilizados ovários de fêmeas bovinas, abatidas em matadouro. Os folículos ovarianos ( $\leq 10$  mm) foram puncionados por meio de agulha 21 G acoplada a seringa de 10 mL e transferidos para placa de Petri contendo meio *Talp-Hepes* e então classificados morfológicamente. Os COCs, selecionados com base no citoplasma homogêneo com no mínimo três camadas de células, foram lavados duas vezes em meio TALP-Hepes e uma vez em meio de maturação *in vitro* (TCM199) e transferidos para a placa *Nunc* (*Thermo Scientific*; Cat.176740) de quatro poços, contendo 400  $\mu$ L de meio de maturação TCM 199 (*Tissue Culture Medium* 199) (Gibco/Invitrogen) suplementado com FSH (Hormônio Folículo Estimulante) e soro de vaca em cio. Foram para a maturação 30 a 40 COCs por gota, em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera com umidade saturada, a 38,5 °C por 22 horas.

Após a maturação, os oócitos foram divididos aleatoriamente em dois grupos e desnudados em hialuronidase para a microinjeção, conforme segue: GM - microinjeção de vetores lentivirais contendo gene repórter GFP no espaço perivitelino de oócitos maturados *in vitro* desnudos; GC - oócitos maturados *in vitro* desnudos, não submetidos à microinjeção. Após a microinjeção os oócitos do GM e GC foram transferido para gotas de fecundação de 100  $\mu$ L e fecundados com concentração de  $1 \times 10^6$  espermatozoides/mL por 18h. Os zigotos foram cultivados em gotas com 100  $\mu$ L de meio CR2aa, suplementado com 2,5% de soro fetal bovino (SFB), em incubadora com 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> e umidade saturada por oito dias, em uma concentração de 15-20 estruturas por gota.

A eficiência da transfecção foi calculada baseada na quantidade de embriões expressando GFP a partir de oócitos microinjetados (GM). A avaliação da expressão do GFP foi realizada visualmente, em blastocistos, por meio de exposição dos mesmos à luz ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, SMZ800, filtro de 450-490nm) ou microscópio (Motic, BA400, filtro de 465-495nm). Os dados foram comparados por ANOVA, considerando nível de significância  $P < 0,05$ . Os valores são mostrados como média  $\pm$  EPM.

## Resultados e Discussão

As taxas de blastocistos encontradas tanto no D7 quanto no D8 não diferiram ( $P > 0,05$ ) entre os grupos, corroborando com Arroyo (2012) e sugerem que não há comprometimento nas taxas de clivagem e na produção de embriões, quando o vetor lentiviral é microinjetado no espaço perivitelíneo de oócitos maduros. Os valores foram mostrados como média  $\pm$  EPM na tabela 1. Foi utilizado um total de sete repetições, entretanto, duas repetições do controle foram perdidas. A taxa de produção de embriões que expressou a proteína GFP foi de 28,5%, indicando serem transgênicos. Esta taxa de embriões transgênicos está abaixo da obtida por Hofmann *et al* (2004), que alcançou 83% de embriões expressando GFP com a microinjeção de vetores lentivirais, mas está acima de valores relatados com o uso da microinjeção pronuclear (11,9%) para bovinos (MURAKAMI *et al.*, 1999).

**Tabela 1.** Efeito da injeção de vetores lentivirais carreando transgene da proteína verde fluorescente (GFP) no espaço perivitelino de oócitos bovinos maturados in vitro sobre o desenvolvimento embrionário e expressão do transgene.

Grupos	n	Clivagem (%)	Blastocistos D7 (%)	Blastocistos D8 (%)	Embriões GFP + (%)
Controle	159	51,06 ± 4,13	12,3 ± 1,31	13,7 ± 0,72	0
Microinjetado	214	48,97 ± 3,26	13,3 ± 2,43	13,1 ± 1,72	28,57

## Conclusões

Estes resultados demonstram que o procedimento de microinjeção de vetores lentivirais no espaço perivitelino de oócitos maturados in vitro é uma alternativa na produção de embriões transgênicos bovinos.

## Agradecimentos

A CNPq.

## Literatura Citada

ARROYO, R. J. O. **Produção de embriões transgênicos bovinos por meio de microinjeção de vetores lentivirais ou transferência nuclear de células somáticas**. 2012. 100 f. Tese (doutorado). Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2012.

COFFIN, J. M.; HUGHES, S. H.; VARMUS, E. H. **Retrovírus**. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997.

HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; SEBALD, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. **Biololy of Reproduction**, v. 71, p 405-409, 2004.

MOFFAT, J.; GRUENEBERG, D. A.; YANG, X.; KIM, S. Y.; KLOEPFER, A. M.; HINKLE, G.; PIQANI, B.; EISENHAURE, T. M.; LUO, B.; GRENIER, J. K.; CARPENTER, A. E.; FOO, S. Y.; STEWART, S. A.; STOCKWELL, B. R.; HACHOEN, N.; HAHN, W. C.; LANDER, E. S.; SABATINI, D. M.; ROOT, D. E. A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. **Cell**, v. 124, p. 1283-1298. 2006

MOISYADI, S.; KAMINSKI, J.M.; YANAGIMACHI, R. Use of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) to generate transgenic animals. **Comparative Immunology Microbiology and Infectious Diseases**, v.32, p.47-60, 2009.

MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; VARISANGA, M. D.; SUZUKI, T. Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.61, p.843-847, 1999.

PARK, F. Lentiviral vectors: are they the future of animal transgenesis? **Physiological Genomics**, v.31, p.159-173, 2007.

WATSON, J. D.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J.; ZOLLER, M. **Recombinant DNA**. Scientific American Books, 2 nd ed., New York, 1992.

# **Avaliação da produção e composição do leite em vacas de primeira lactação da raça Guzerá**

## **Evaluation of milk yield and composition in Guzerá first-lactating cows**

Taísa Nascimento de Souza<sup>1</sup>, Maria Gabriela C.D. Peixoto<sup>2</sup>, Rui da Silva Verneque<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG. e-mail: taisasouza\_@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG.

**Resumo:** A Embrapa Gado de Leite vem contribuindo, desde 1994, para o melhoramento genético da raça Guzerá, tendo como objetivo principal a produção de leite. Essa raça tem sido cada vez mais procurada pelos pecuaristas devido à dupla aptidão. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a produção de leite e os teores de proteína, gordura e sólidos totais dos animais participantes do Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá. Para isso foram utilizados dados de rebanhos puros obtidos a partir de controles leiteiros realizados mensalmente e analisados através do software estatístico SAS (2003), utilizando o procedimento MIXED para a obtenção das médias. Comparando-se as médias históricas (1994 a 2010) com as médias dos anos de 2011 e 2012, pode-se observar o aumento na produção de leite e expressiva elevação da duração de lactação. Além disso, observou-se o efeito da sazonalidade sobre a produção de leite na raça Guzerá. Foi verificada tendência de queda no teor de gordura, enquanto que, para os teores de proteína e sólidos totais não foram observadas tendências claras de aumento ou diminuição desses valores.

**Palavras-chave:** guzerá, leite, melhoramento genético, zebu.

**Abstract:** Embrapa Dairy Cattle, since 1994, has contributed to the genetic improvement in Guzerá breed, focusing on milk yield. Guzerá is a dual purpose breed and has been increasingly requested by farmers. Data from Brazilian Dairy Guzerat Breeding Program were used to evaluate milk production and protein, fat and total solids yield. Data were obtained from milk samples that were monthly collected in the test-day, in purebred herds, and were analyzed using the SAS statistical software (2003), using the MIXED procedure. Increased milk yield was noted comparing historical averages (1994-2010) with the averages of 2011 and 2012, and also increased lactation length. It was observed seasonal effect on milk yield in Guzerá. Downward trend was verified to fat yield, whereas to protein and total solids were not observed a clear trend.

**Keywords:** breeding, Guzerá, milk, zebu.

### **Introdução**

A raça Guzerá é originária da região de Gujarat na Índia, caracterizada pelo ambiente seco e hostil, sendo que os primeiros exemplares foram importados em 1870. Os rebanhos Guzerá estão distribuídos no Brasil, com maior concentração nas regiões Sudeste e Nordeste, sendo que a maior parte corresponde à criação de animais puros. Esses animais se destacam pela rusticidade, termotolerância, resistência à endo e ectoparasitas, além de serem explorados economicamente para a produção de leite e carne. No Brasil, 25% do leite produzido provém de fazendas mistas, com animais de dupla aptidão (BARBOSA & BUENO, 2000) reforçando a importância da raça no cenário nacional. Com o início do Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite, em 1994, e utilização dos resultados provenientes da avaliação genética, foram observados nos últimos anos, avanços expressivos quanto à aptidão leiteira dos animais. Tradicionalmente, o melhoramento das raças zebuínas leiteiras tem como foco a produção de leite, no entanto, existe a demanda tanto dos consumidores quanto da indústria por leite de melhor qualidade. O objetivo desse trabalho é avaliar a produção de leite e o teor de proteína, gordura e sólidos totais da raça Guzerá, em rebanhos participantes do programa de melhoramento.

## Material e Métodos

Foram utilizados 4094 dados de lactações, coletados entre os anos de 1994 a 2010, de 78 rebanhos puros participantes do Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite, coordenado pela Embrapa Gado de Leite. Os dados de produção foram obtidos a partir de controles leiteiros realizados mensalmente nas propriedades e as amostras de leite foram enviadas ao Laboratório de Qualidade do Leite (EGL/RBQL), a partir de 1999, para as análises de sua composição e realizadas eletronicamente por espectroscopia por absorvância do infravermelho próximo. Os dados foram analisados através do software estatístico SAS (2003), com utilização do procedimento MIXED para obtenção das médias anuais e mensais e seus respectivos erros-padrão, por meio do método de quadrados mínimos. Foram avaliadas as características de produção de leite (kg) e teor de gordura, de proteína e de sólidos totais (%). Para análise de médias anuais, foram considerados os efeitos fixos de rebanho, ano e época do parto, além do resíduo como efeito aleatório. Por sua vez, nas análises de médias mensais, foram considerados os efeitos fixos de rebanho, ano e mês do parto.

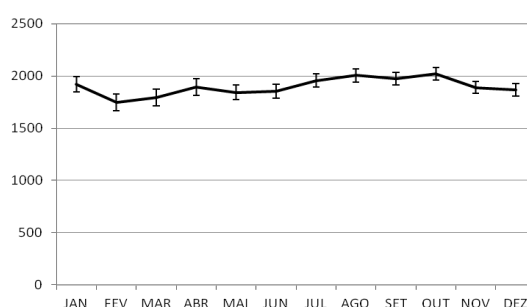
## Resultados e Discussão

As médias de produção e duração da lactação estão na Tabela 1. Comparando-se as médias históricas (1994 a 2010) com as médias dos anos de 2011 e 2012, pode-se observar o aumento na produção de leite. O programa de melhoramento tem obtido bons resultados com o aumento expressivo da duração da lactação.

**Tabela 1.** Produção de leite e suas composições dos anos de 1994 a 2010.

	Anos de 1994 a 2010	2011	2012
Produção de leite em 305 dias	1.904 ± 999Kg	2.108 ± 996Kg	2.121 ± 1.106Kg
Produção de Gordura	78 ± 47Kg	97 ± 47Kg	89 ± 51Kg
Produção de Proteína	59 ± 34Kg	63 ± 29Kg	59 ± 32Kg
Produção de Sólidos Totais	233 ± 112Kg	236 ± 111Kg	223 ± 112Kg
Duração da Lactação	241 dias	273 dias	273 dias

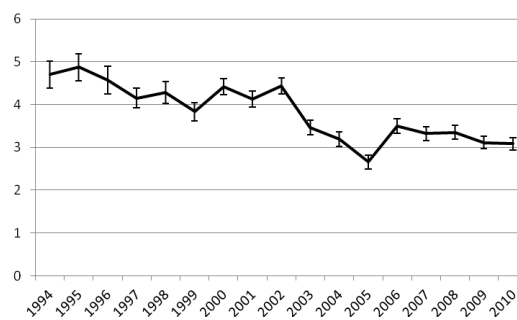
A produção média de leite em 305 dias, de acordo com o mês de parição, incluindo dados de 1994 a 2010, é mostrada na Figura 1. É possível observar o efeito da sazonalidade sobre a produção de leite.



**Figura 1.** Produção de leite, mensalmente para os anos de 1994 a 2010

O teor médio de gordura nos anos de 1994 a 2010, foi de 78 ± 47 Kg (Tabela 1). A raça Guzerá, segundo Santos (2005) produz o leite com maior teor de gordura entre as zebuínas.

A Figura 2 traz as médias do teor de gorduras mensurados para as lactações resultantes dos partos ocorridos entre 1994 e 2010.



**Figura 2.** Teor gordura nos anos de 1994 a 2010

Ao contrário dos dados para teor de gordura, disponíveis desde 1994, as análises para teores de proteína e sólidos totais começaram a ser realizadas a partir do ano de 1999, sendo os valores médios até 2010, de  $59 \pm 34$  Kg e  $233 \pm 112$  Kg, respectivamente (Tabela 1). Não é possível observar tendência clara dos teores de proteína e sólidos totais (Figuras 3 e 4), pois, não há seleção direta para essas características no programa e as variações podem ser explicadas como iniciativa individual do produtor ao estabelecê-las como critério de seleção na propriedade.

Figura 3 Produção de proteína nos anos de 1994 a 2010

de 1994 a 2010

Figura 4 Produção de sólidos totais nos anos

## Conclusões

A produção de leite nos últimos anos foi superior às médias históricas da raça, como reflexo do programa de seleção. De modo geral observou-se o efeito da sazonalidade sobre a produção de leite na raça Guzará. Foi verificada tendência de queda no teor de gordura, enquanto para os teores de proteína e sólidos totais não foram observadas tendências claras de aumento e diminuição.

## Agradecimentos

A CNPq

### **Literatura Citada**

BARBOSA, P.F.; BUENO, R.S. Sistemas mistos de produção de leite e carne bovina. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE GADO DE LEITE, 2000, Goiânia, **Anais...** Goiânia, 2000.p.53-68.

SANTOS, R. O caminho da pecuária dos trópicos passa por uma vaca leiteira. **Guzerá O gado do Brasil**. Uberaba: Editora Agropecuária Tropical Ltda, p. 422-454

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **User's guide**. Version 9. 1.ed. Cary: SAS Institute, 2003. 5136p..



# Massa de forragem e características estruturais do pasto de capim-Marandu submetido a período de descanso ou fixo ou variável<sup>1</sup>

## Forage mass and structural traits of Marandugrass pasture submitted to a fixed or variable rest period

Vinícius Sacramento Pacheco<sup>2</sup>, Carlos Augusto de Miranda Gomide<sup>3</sup>, Albert José dos Anjos<sup>4</sup>, Mirton José da Frota Morenz<sup>3</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>3</sup>, Fermino Deresz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Parte da dissertação do terceiro autor

<sup>2</sup>Bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Gado de Leite – email: sacramentopacheco@hotmail.com

<sup>3</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite – e-mail: carlos.gomide@embrapa.br

<sup>4</sup>Mestre em Zootecnia pela UFVJM – email: albert@zootecnista.com.br

**Resumo:** Apesar de amplamente difundido e altamente prático, o sistema de pastejo intermitente com período de descanso baseado em dias fixos se mostrou ineficiente por negligenciar as características morfológicas e fisiológicas do pasto. O presente estudo avaliou dois critérios de manejo para o período de descanso em pastejo intermitente em capim-Marandu: um com 30 dias fixo e outro com base na interceptação de 95% da radiação incidente pelo dossel forrageiro. O período de ocupação dos piquetes foi de três dias buscando alcançar um resíduo de 25 cm em ambos os tratamentos. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com duas repetições de área, e três repetições dentro de bloco. As variáveis analisadas ao longo dos ciclos de pastejo da estação chuvosa foram: altura do pasto, massa seca verde (MSV), percentual de lâmina foliar e de material morto. Os pastos de capim-Marandu manejados pelo critério de interceptação luminosa apresentaram menor altura em pré-pastejo (36 X 42 cm), maior no percentual de folhas, menor percentual de material morto e menor MSV por ciclo de pastejo. Contudo, a menor MSV por ciclo é compensada por mais ciclos de pastejo dentro da estação chuvosa em resposta ao menor intervalo entre pastejos (22,3 X 30 dias).

**Palavras-chave:** altura, ciclo de pastejo, interceptação luminosa, percentual de lâmina foliar, período de descanso.

**Abstract:** Although widespread and highly practical, the intermittent grazing system based on fixed rest period was inefficient for neglecting the morphological and physiological characteristics of the pasture. This study evaluated two management criteria for the rest period in the intermittent grazing on Marandugrass: the first fixed with 30 days and one based on 95% of light interception by the canopy. In both the occupancy period was three days and maintaining the residual height of 25 cm. The experimental design was randomized blocks with two plots and three replicates within a block. The variables analyzed over the grazing periods of the rainy season were: height of the canopy, green dry matter (GDM), percentage of leaf and dead material. The pastures grazed by the light interception criterion had lower pre-grazing height (36 X 42 cm), largest percentage of leaves, lower percentage of dead material and lower GDM per grazing cycle. However, the lower GDM per cycle is offset by more cycles grazing in the rainy season in response to lower rest period for the light interception criterion (22.3 x 30 days).

**Keywords:** canopy height, grazing cycle, leaf percentage, light interception, rest period.

## Introdução

O sistema de pastejo intermitente tem se tornado uma prática bastante utilizada, porém, períodos de descanso com base em dias fixos se mostraram bastante ineficientes

com relação ao controle das características do pasto (PEDREIRA et al., 2007). A principal maneira de modificar tais características consiste na utilização de estratégias de manejo com base na interceptação de radiação fotossinteticamente ativa (PEDREIRA et al., 2007). A frequência de desfolha baseada em critérios que respeitam os estágios de desenvolvimento da planta permite ganhos sobre a forragem ofertada, bem como a melhora de aspectos morfológicos e consequentemente nutricionais.

O capim-Marandu é uma das principais forrageiras utilizadas nos sistemas de produção pecuários Brasil e apesar de trabalhos terem levantados informações sobre seu manejo, dados sobre seu potencial de uso em ensaios de pastejo completos são ainda escassos. Assim, o presente estudo avaliou dois critérios para definição do período de descanso sob pastejo intermitente, um conforme a interceptação de 95% da radiação fotossinteticamente ativa e outro fixo de 30 dias, e sua influência sobre a composição morfológica e as características estruturais em pastos de capim-marandu.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental pertencente a Embrapa Gado de Leite e localizado na Zona da Mata de Minas Gerais. As coordenadas geográficas do local são 21°33' de latitude Sul e 43°16' de longitude Oeste, a 410 metros de altitude. O clima da região segundo Koppen é do tipo Cwa (mesotérmico), verão chuvoso e inverno seco, entre os meses de junho a setembro. O período experimental foi de 18 de outubro de 2011 a 03 de maio de 2012, em uma área de quatro hectares de *Brachiaria brizantha* Jacq. cv. Marandu, implantada em uma área de solo classificado como Neossolo Flúvico Distrófico (EMBRAPA, 1999).

Foram utilizadas 16 vacas Holandês x Zebu, com peso vivo médio de 495 kg empregando-se oito animais por tratamento, sendo quatro animais por repetição. Os tratamentos consistiram de avaliações de duas estratégias de manejo do pastejo rotacionado baseado no momento da entrada dos animais nos piquetes: 1) quando o pasto atingia 95% de interceptação da radiação fotossinteticamente ativa (IRFA95) e 2) com 30 dias de descanso (fixo). O período de ocupação foi de três dias, em ambos os tratamentos almejando-se um resíduo pós-pastejo de 25 cm de altura. Durante o período experimental a pastagem foi adubada com 50 kg/ha de N e de K<sub>2</sub>O e 12,5 kg/ha de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> na forma do adubo 20-05-20 sempre que os animais saíam dos piquetes.

O delineamento experimental utilizado foi o de blocos ao acaso, com duas repetições de área, e três repetições dentro de bloco. A área total do experimento foi constituída de 11 piquetes de 850 m<sup>2</sup> cada, por tratamento. No tratamento IRFA95 quando se utilizou menor número de piquetes, os demais foram manejados segundo o mesmo critério por meio de animais extras o que possibilitou o ajuste do período de descanso nos diferentes ciclos de pastejo, já que o alcance da condição de IRFA95 varia em função das condições climáticas.

Para o monitoramento da IRFA95 pelo dossel forrageiro, foi utilizado o equipamento analisador de dossel AccuPAR Model LP-80. As avaliações constituíram de leituras realizadas em 10 pontos do piquete, no momento anterior à entrada dos animais no piquete (pré-pastejo), as quais foram realizadas em todas as unidades experimentais do tratamento com PD variável conforme a IRFA95 e, no mínimo, em duas unidades experimentais do tratamento com PD fixo, por ciclo de pastejo.

A altura do dossel forrageiro foi monitorada antes da entrada dos animais no piquete (pré-pastejo) e depois de sua saída (pós-pastejo), utilizando uma régua cilíndrica, graduada em centímetros, sendo medidos 40 pontos aleatórios por piquete. Foram realizadas coletas de forragem em três pontos do piquete, representativos da condição do pasto (altura e cobertura), com o auxílio de uma moldura metálica de 0,50 x 0,50 m, ao nível do solo a fim de se obter a massa verde (MV) no pré e pós-pastejo, para cada tratamento.

Foram retiradas subamostras representativas da forragem coletada, as quais foram pré-secas em estufa de circulação forçada de ar a 55°C por 72 horas, e posteriormente pesadas. Uma alíquota de peso conhecido e que representasse as amostras colhidas foi retirada para a determinação da massa de forragem pré e pós-pastejo, sendo esta alíquota

separada nas frações lâmina foliar, colmo (colmo+bainha) e material morto, e posteriormente, secas pelo método supracitado e em seguida pesadas. Os valores de massa de forragem de cada componente morfológico foram convertidos para kg/ha de massa seca e os mesmos expressos em percentual (%) da massa total de forragem.

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância com o PROC MIXED do SAS®, e as médias foram comparadas pelo teste LSMEANS ao nível de 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Observou-se efeito de ( $P < 0,05$ ) de critério para o período de descanso, ciclo de pastejo e da interação destes dois critérios para a altura do pasto em pré-pastejo (Tabela 1).

Ambos os critérios apresentaram as maiores alturas no ciclo dois e não se notou diferença entre os ciclos dois e cinco para o critério de PD fixo de 30 dias. A equidade em altura entre os dois critérios no segundo ciclo pode ser explicada pela condição climática favorável, aliada à adubação que permitiu o rápido crescimento das gramíneas manejadas sobre o critério com base IRFA95, mesmo com menor período de descanso. Já a menor altura foi encontrada no ciclo cinco do critério com base IRFA95 e no ciclo três e quatro para o critério de PD fixo, decorrentes de um veranico de 17 dias no período.

De modo geral não se observou diferenças na altura de pré-pastejo entre os critérios, exceto para o ciclo um e cinco do critério de PD baseado IRFA95. A menor altura média geral foi encontrada para o critério baseado na IRFA95 (Tabela 1). A altura do pasto neste critério mostra-se mais próxima das alturas ideais proposta por Flores et al. (2008) entre 25 e 40 cm para o manejo do capim-Marandu.

**Tabela 1.** Altura pré-pastejo (cm) em resposta aos critérios para período de descanso e ciclos de pastejo.

Ciclo	Período de descanso		Erro padrão
	IRFA 95	30 dias	
1	33,8BCb	39,3Ba	1,9
2	42,0Aa	47,5Aa	3,5
3	33,2Ca	38,2Ba	1,9
4	38,4ABa	37,7Ba	2,0
5	32,1Cb	49,0Aa	1,5
Média	35,9b	42,3a	1,4

Médias seguidas da mesma, letra maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste LSMEANS a 5% de probabilidade.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) da interação critério para período de descanso x ciclo de pastejo para a massa seca verde (MSV) no pré-pastejo (Tabela 8). A menor MSV foi observada no ciclo um, em ambos os critérios. Com relação à maior MSV, ela foi predominante no ciclo cinco, em ambos os critérios de PD, sendo que no critério de PD fixo o valor do ciclo cinco não diferiu do obtido no ciclo quatro.

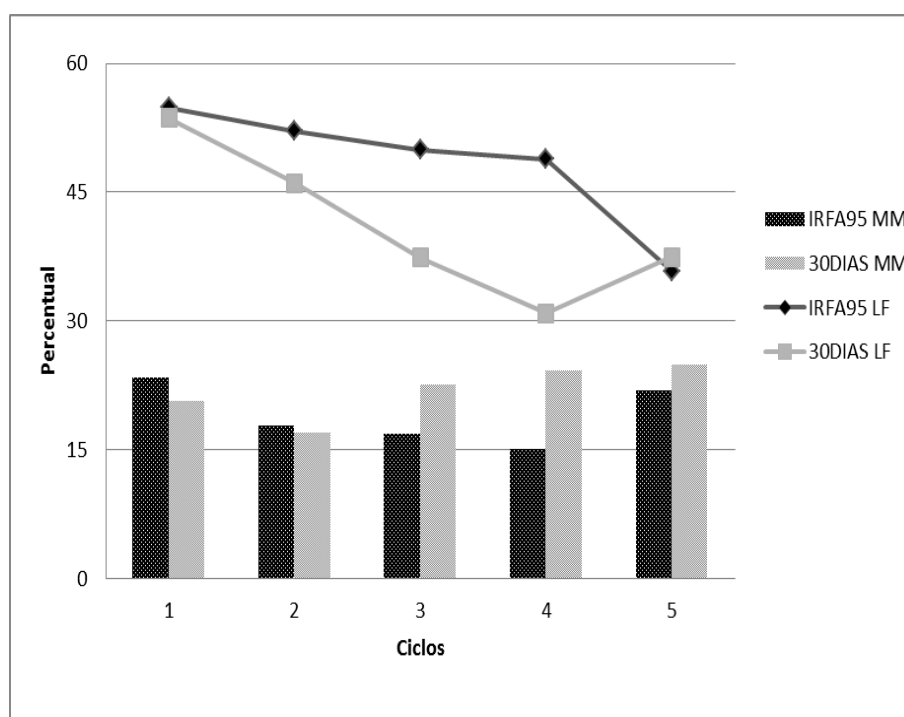
**Tabela 2.** Massa seca verde (kg/ha.ciclo) no pré-pastejo em resposta aos critérios para período de descanso e ciclos de pastejo.

Ciclo	Período de descanso		Erro padrão
	IRFA 95	30 dias	
1	3.444Ca	3.728Ca	301,6
2	4.093BCa	4.885Ba	301,6
3	3.6664Ca	4.460Ba	301,6
4	4.805Bb	6.805Aa	301,6
5	6.048Aa	6.575Aa	301,6
Média	4.411b	5.290a	197,6

Médias seguidas da mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem entre si pelo teste LSMEANS a 5% de probabilidade.

Diferença na MSV entre os critérios de PD foi observada apenas no ciclo quatro, quando o critério de PD fixo apresentou maior MSV em relação ao critério com IRFA95. Na média, o critério com base em dias fixos (PD fixo) obteve uma maior MSV no pré-pastejo, se comparado ao critério de PD com base na IRFA95. O maior intervalo de pastejo imposto por esse critério de PD justifica essa diferença, porém, a maior MSV também é reflexo da maior produtividade de colmo encontrada nessa situação, uma vez que não houve diferença na massa seca de folhas entre os dois critérios de PD (2.537 vs. 2.784 kg/MS de folha/ha.ciclo). Além disso, o menor PD médio observado no tratamento baseado na IRFA de 95% (22,8 X 30 dias) possibilita um maior número de ciclos de pastejo, compensando o menor valor médio da MSV para o tratamento IRFA de 95% observado na Tabela 2.

A Figura 1 abaixo mostra os percentuais de lâmina foliar e material morto ao longo dos ciclos de pastejo em função dos tratamentos. Observa-se redução gradual do percentual de lâminas foliares na forragem em pré-pastejo com o suceder dos ciclos. Tal redução, entretanto é mais acentuada no manejo com PD fixo de 30 dias, passando de 54% no primeiro ciclo para 31% já no quarto ciclo. Segundo Alexandrino et al. (2005), o incremento na biomassa em resposta ao aumento no intervalo de pastejo é resultante do incremento do colmo, que faz com que a proporção de folhas reduza. Sob manejo baseado na IRFA de 95% nota-se uma redução mais suave até o quarto ciclo, se acentuando apenas no quinto ciclo, provavelmente em resposta às condições climáticas desfavoráveis. Sendo as folhas os componentes morfológicos de maior valor nutritivo (TRINDADE et al., 2007), tal critério mostra-se superior ao critério com base em PD fixo.



**Figura 1.** Percentual de lâmina foliar (LF) e material morto (MM) na massa seca da forragem em pré-pastejo em resposta aos critérios para período de descanso e ciclo de pastejo.

O percentual de material morto (MM) por sua vez aumenta após o segundo ciclo no tratamento com PD fixo de 30 dias, enquanto que para o tratamento IRFA 95% apenas no quinto ciclo há uma elevação do percentual deste componente. A análise conjunta destes dois componentes revela a superioridade do tratamento baseado na IRFA em termos da estrutura do pasto em pré-pastejo. Neste sentido, Carnevali et al (2006) estudando a estrutura do pasto de capim-Mombaça também observaram redução na participação de lâminas foliares na massa de forragem em pré-pastejo em resposta ao prolongamento do intervalo entre pastejo, reduzindo de 71% sob IRFA de 95% para 60% sob IRFA de 100%.

## Conclusões

O manejo do pasto de capim-Marandu com período de descanso baseado na interceptação da radiação fotossinteticamente ativa de 95% propicia menor altura pré-pastejo e permite ganhos qualitativos da forragem por melhorar o percentual de lâminas foliares sem comprometimento à massa de forragem, notadamente de folhas.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica, à Embrapa Gado de Leite e ao Dr. Carlos Augusto de Miranda Gomide pela oportunidade de realização do treinamento.

## Literatura Citada

ALEXANDRINO, E.; GOMIDE, C.A.M.; CÂNDIDO, M.J.D. et al. Período de descanso, características estruturais do dossel e ganho de peso vivo de novilhos em pastagem de capim Mombaça sob lotação intermitente. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.34, n.6, p.2174-2184, 2005 (supl.).

CARNEVALLI, R.A., SILVA, S.C., OLIVEIRA, A.A. et al. Herbage production and grazing losses in *Panicum maximum* cv. Mombaça pastures under four grazing managements. **Tropical Grasslands**, p. 165-176, v.40, 2006.

EMBRAPA. Centro Nacional de Pesquisa de Solos. Sistema Brasileiro de Classificação dos Solos. Brasília: EMBRAPA PRODUÇÃO DE INFORMAÇÃO/EMBRAPA SOLOS, 1999.412 p.

FLORES R.S.; EUCLIDES, V.P.B.; ABRÃO, M.P.C. et al. Desempenho animal, produção de forragem e características estruturais dos capins marandu e xaraés submetidos a intensidades de pastejo. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.37, n.8, p.1355-1365, 2008.

PEDREIRA, B.C.; PEDREIRA, C.G.S.; DA SILVA, S.C. Estrutura do dossel e acúmulo de forragem de *Brachiaria brizantha* cultivar Xaraés em resposta a estratégias de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.42, n.2, p.281-287, fev. 2007.

# **Composição morfológica e acúmulo de forragem de *Brachiaria decumbens* em sistema silvipastoril ou monocultivo**

## **Morphological composition and forage accumulation in *Brachiaria decumbens* in silvopastoral system or monoculture**

Diego Rafael Gonzaga<sup>1</sup>, Bruno da Costa Domith<sup>1</sup>, Priscila Beligoli Fernandes<sup>2</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmico do curso de Ciências Biológicas – CES/JF e-mail: diego.gonzaga@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

<sup>3</sup>Pesquisador – Embrapa Gado de Leite e-mail: domingos.paciullo@embrapa.br

**Resumo:** O trabalho teve como objetivo avaliar a composição morfológica e o acúmulo de forragem de *B. decumbens* em monocultivo ou sistema silvipastoril, submetida ao pastejo de lotação contínua, durante o verão e outono. Foi usado delineamento de blocos completos casualizados, com dois tratamentos e três repetições. O experimento foi realizado no período de dezembro de 2011 a junho de 2012. As variáveis, massa de forragem total, massa de colmos e acúmulo de forragem não variaram com o tipo de sistema e com a estação do ano. A massa de folhas foi influenciada pela interação tipo de sistema x estação do ano, sendo maior no monocultivo que no sistema silvipastoril no outono. Os resultados indicam a relativa tolerância da *B. decumbens* ao sombreamento moderado, caracterizada pela semelhança nos valores de composição morfológica e acúmulo de forragem dos dois sistemas.

**Palavras-chave:** massa de folhas, massa de forragem, pastejo, sombreamento.

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the morphological composition and the herbage accumulation of *B. decumbens* in monoculture and silvopastoral system, under continuous stocking during the summer and autumn. The randomized block design with two treatments and three replications was used. The experiment was performed from December 2011 to June 2012. The total forage mass, stem mass and herbage accumulation did not vary with the type of system and season of the year. The leaf mass was influenced by system x season of the year interaction and was higher in the monoculture than in the silvopastoral system during the autumn. The results indicate the relative tolerance of *B. decumbens* to moderate shade, characterized by the similarity in the values of morphological composition and herbage accumulation of the two systems.

**Keywords:** forage mass, grazing, leaf mass, shading.

## **Introdução**

O termo sustentabilidade tem sido usado em agricultura, denotando a necessidade de se obter produtos agrícolas, pecuários ou florestais, de modo econômico, em longo prazo, a fim de não comprometer a conservação dos recursos naturais.

O avanço do processo de degradação das pastagens comporta uma redução progressiva da produtividade e do valor nutritivo das forrageiras e, conseqüentemente, da produção animal, o que tem constituído em uma das principais limitações à sustentabilidade dos sistemas de produção de bovinos baseados em pastagens. O uso de sistemas silvipastoris para recuperação e desenvolvimento de pastagens em regiões de pecuária de leite se torna eficiente, tendo em vista alguns benefícios como conservação do solo e da água, melhoria da fertilidade do solo e o conforto térmico para os animais. Porém, as árvores reduzem a luminosidade disponível para as pastagens que crescem sob suas copas, condição que afeta aspectos morfogenéticos determinantes da sua produtividade (CARVALHO, 2001).

Embora ainda escassos, os estudos sobre os aspectos morfofisiológicos mostram que os efeitos variam com a tolerância da espécie à sombra, a fertilidade do solo e o nível de sombreamento (CASTRO *et al.*, 2009). A literatura indica que, para gramíneas do gênero *Brachiaria*, as produções de forragem sob sombreamento moderado (redução de 25 a 35% da radiação fotossinteticamente ativa) têm sido semelhantes ou até maiores do que a pleno sol (PACIULLO *et al.*, 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição morfológica e o acúmulo de massa seca de forragem de *Brachiaria decumbens* em sistema silvipastoril e monocultivo, submetida ao regime de lotação contínua, durante o verão e outono.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG, em um sistema silvipastoril instalado em área de topografia montanhosa, com declividade de aproximadamente 30%, durante o período de dezembro de 2011 a junho de 2012. O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, distrófico. A precipitação média mensal é de 60 mm e temperatura média de 17 °C, de abril a setembro, e de 230 mm e 24 °C, de outubro a março.

O delineamento experimental adotado foi de blocos completos casualizados, com dois tratamentos e, três repetições, sob um arranjo de parcelas subdivididas. Nas parcelas foram alocados os tratamentos que consistiram do tipo de sistema avaliado (monocultivo ou silvipastoril), com área de cada parcela de 1,5 ha. Nas subparcelas, foram alocadas as estações do ano (verão e outono).

Os piquetes foram manejados segundo o método de lotação contínua. Cada piquete foi pastejado por três novilhas Holandês x Zebu (animais de prova), de peso vivo inicial médio de 150 kg, perfazendo um total de 18 animais de prova. Animais reguladores foram colocados e retirados de cada piquete, a fim de se manter a altura média do pasto de 30 cm.

A massa de forragem foi estimada com base em cortes realizados em todos os piquetes, com uma frequência de 21 dias. Para isso, 10 amostras foram coletadas, em cada piquete, com auxílio de moldura metálica de 0,5 x 0,5 m, nos pontos médios da altura. Nos piquetes arborizados foram coletadas três amostras na faixa de árvores e sete na faixa sem árvores, a fim de se obter representatividade adequada da condição média do pasto. As plantas foram cortadas a altura de 5 cm do solo, sendo em seguida levadas ao laboratório para pesagem. Duas amostras foram obtidas, sendo uma para determinação do teor de matéria seca da massa total de forragem e a outra para separação das frações verde e morta. Da fração verde foram separadas as folhas e colmos.

Os materiais foram, então, secos em estufa de ventilação forçada a 55 °C, por 72 horas, para determinação da matéria seca. Para o acúmulo de forragem foram utilizadas três gaiolas de exclusão (0,49 m<sup>2</sup>) por piquete. Nos piquetes arborizados uma gaiola foi alocada sob a copa das árvores, a fim de estimar o acúmulo sob a influência do sombreamento. A escolha do ponto de exclusão foi tomada com base na altura média do pasto. No dia zero (fixação das gaiolas), para cada gaiola fixada, foram escolhidos dois pontos semelhantes quanto às condições de altura do pasto e cobertura do solo. Um ponto foi alocado sob a gaiola e o outro foi usado para estimativa da massa de forragem no dia zero. Decorridos 21 dias, a massa de forragem acumulada no interior da gaiola foi cortada, em área de 0,5 x 0,5 m. Transcorridos sete dias desta avaliação, as gaiolas foram realocadas e um novo ciclo de 21 dias teve início, seguido de outro período de sete dias sem gaiolas, e assim sucessivamente até o final do período avaliado.

O acúmulo de forragem foi estimado pelo método agrônomo da diferença (DAVIES *et al.*, 1993), conforme a equação:  $AF = MF_f - MF_i$ , sendo: AF = acúmulo de forragem;  $MF_f$  = massa de forragem, sob a gaiola, no último dia de exclusão (21<sup>o</sup> dia);  $MF_i$  = massa de forragem na colocação das gaiolas (1<sup>o</sup> dia). As taxas de acúmulo de forragem foram calculadas pela divisão dos valores de acúmulo de forragem pelo número de dias de exclusão do pasto.

As análises de variância foram realizadas por meio do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS® (*Statistical Analysis System*), versão 9.0 para *Windows*, específico para casos de medidas repetidas no tempo e em que o tempo é um fator a ser estudado como causa de variação. A análise de variância feita com base nas seguintes causas de variação: tipo de sistema, estações do ano e as interações entre elas. O tipo de sistema adotado, estações do ano e suas interações foram considerados como fixos e, como efeitos aleatórios, foram considerados o erro experimental entre unidades e o erro para a mesma unidade no tempo. As médias dos tratamentos foram estimadas utilizando-se o “LSMEANS” e a comparação entre elas, quando necessária, realizada por meio da probabilidade da diferença (“PDIFF”) usando o teste “t” de “Student” e nível de probabilidade de 5%.

## Resultados e Discussão

Não foi verificado efeito ( $P > 0,05$ ) de tipo de sistema e de estação do ano para a massa seca de forragem total (valor médio de  $2.446 \text{ kg ha}^{-1}$ ). A massa seca de folhas (MDF) foi influenciada ( $P < 0,05$ ) pela interação entre tipo de sistema e estação do ano (Tabela 1). Para o sistema silvipastoril, não houve diferença entre as estações; no monocultivo, a massa de folha do outono foi maior que a do verão.

Poderia se esperar maiores massas de folhas no verão, em virtude das maiores precipitações normalmente observadas nessa estação, entretanto, houve um período de 28 dias sem chuvas (veranico) entre fevereiro e março, que comprometeu o crescimento do pasto, em ambos os sistemas. Associado a isto, observou-se intenso ataque de cigarrinhas-das-pastagens (*Deois flavopicta* e *Zulia entreciriana*) nesse mesmo período, principalmente no sistema silvipastoril, o que pode ter contribuído para limitação do crescimento das plantas no verão.

No início do outono, o ciclo de ataque de cigarrinha se completou e as chuvas retornaram e perduraram por toda a estação. Além disso, foi realizada adubação com nitrogênio, fósforo e potássio nesse período o que possibilitou a retomada do crescimento do pasto. Este fato explicaria a maior massa de folhas no monocultivo no outono, quando comparado ao verão. Contrariamente a esse resultado, para o sistema silvipastoril, a massa de folha do outono foi semelhante a do verão. É possível que o ataque mais intensivo de cigarrinha neste sistema, que ocasionou maiores danos às folhas das plantas, associado ao sombreamento, que se constitui naturalmente em um fator de estresse às plantas, tenha contribuído para a menor massa de folhas no sistema silvipastoril no outono, em relação ao monocultivo.

**Tabela 1.** Massa seca de folha ( $\text{kg ha}^{-1}$ ) em sistema silvipastoril e em monocultivo durante o verão e outono.

Estação do Ano	Tipo de Sistema <sup>(1)</sup>		
	Sistema Silvipastoril	Monocultivo	EPM <sup>(2)</sup>
Verão	690 Aa	712 Ba	40,3
Outono	660 Ab	1.431 Aa	114,1

<sup>(1)</sup> Médias seguidas pela mesma letra minúscula na linha e pela mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si ( $P < 0,05$ ) pelo teste “t” de “Student” (“PDIFF”).

<sup>(2)</sup> Erro padrão da média.

A massa seca de colmos não apresentou efeito ( $P > 0,05$ ) para o tipo de sistema e estação do ano. As médias apresentadas foram de  $1.020$  e  $1.340 \text{ kg ha}^{-1}$  para sistema silvipastoril e monocultivo, respectivamente. Da mesma forma, a massa seca de material morto não apresentou efeito ( $P > 0,05$ ) de sistema e estação do ano. O sistema arborizado apresentou média de  $415 \text{ kg ha}^{-1}$  e o sistema de monocultivo média de  $625 \text{ kg ha}^{-1}$ . Não foi verificado efeito ( $P > 0,05$ ) de tipo de sistema e de estação do ano para a taxa de acúmulo de massa seca de forragem.

A semelhança entre os sistemas para as variáveis analisadas, com exceção da massa seca de folha no outono, maior no monocultivo que no sistema silvipastoril,



confirmam a relativa tolerância da *B. decumbens* ao sombreamento moderado (PACIULLO *et al.*, 2007; GUENNI *et al.*, 2008).

## Conclusões

*B. decumbens* é relativamente tolerante ao sombreamento moderado, caracterizada pela semelhança nos valores de composição morfológica e acúmulo de forragem nos sistemas silvipastoril e no monocultivo

## Agradecimentos

Ao professor Fernando Teixeira Gomes, ao pesquisador da Embrapa Gado de Leite Domingos Sávio Campos Paciullo, ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq pela bolsa concedida de Iniciação Científica e aos demais colegas que estiveram presentes durante a realização das atividades desenvolvidas.

## Literatura Citada

CARVALHO, M. M. Contribuição dos sistemas silvipastoris para a sustentabilidade da atividade leiteira. In: Simpósio sobre sustentabilidade de sistemas de produção de leite a pasto e em confinamento. Juiz de Fora, 2001. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 85-108.

CASTRO, C.R.T.; PACIULLO, D.S.C.; FERNANDES, P.B. Morfogênese e perfilamento do capim Tanzânia conforme os suprimentos de nitrogênio e luz. In: Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 46., 2009, Maringá. **Anais...** Maringá: UEM.

DAVIES, D.A.; FORTHERGILL, M.; MORGAN, C.T. Assessment of contrasting perennial ryegrass, with and without white clover, under continuous sheep stocking in the uplands: 5. herbage production, quality and intake in years 4-6. **Grass and Forage Science**, v.48, p.213-222, 1993.

GUENNI, O.; SEITER, S.; FIGUEROA, R. Growth responses of three *Brachiaria* species to light intensity and nitrogen supply. **Tropical Grasslands**, v.42, p.75-87, 2008.

PACIULLO, D.S.C.; CARVALHO, C.A.B.; AROEIRA, L.J.M. et al. Morfofisiologia e valor nutritivo do capim-braquiária sob sombreamento natural e a sol pleno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.42, p.573-579, 2007.

WOLFINGER, R.D. Covariance structure selection in general mixed models. **Communications in Statistics Simulation and Computation**, v.22, p.1079-1106, 1993.

# **Cinética de fermentação de silagem de três híbridos de milho em diferentes idades de corte estimada pela técnica de produção de gases *in vitro*<sup>1</sup>**

## **Kinetics of fermentation of silage maize hybrids at three different harvesting ages estimated by the semiautomatic *in vitro* gas production technique**

Larissa Gomes dos Reis<sup>2</sup>, Ellen de Almeida Moreira<sup>3</sup>, Fernando Pimont Pôssas<sup>4</sup>, Tainá Silvestre Moreira<sup>5</sup>, Paula Pereira Ribeiro de Moura<sup>6</sup>, Maysa Andrade<sup>6</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>7</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>7</sup>, Lucio Carlos Gonçalves<sup>8</sup>, Jose Avelino dos Santos Rodrigues<sup>9</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>10</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado do terceiro autor

<sup>2</sup>Graduanda em Farmácia – UFJF. Bolsista do CNPq/PIBIC. e-mail: larissagomesreis@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Biomédica. Bolsista de DTI – 3 CNPq

<sup>4</sup>Doutorando em Zootecnia – UFMG/Belo Horizonte. Bolsista do CNPq

<sup>5</sup>Doutoranda em Zootecnia – USP/Pirassununga. Bolsista de DTI – 3 CNPq

<sup>6</sup>Graduanda em Farmácia – UFJF. Bolsista PIBIC/Fapemig

<sup>7</sup>Pesquisadora Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

<sup>8</sup>Professor Adjunto da Escola de Veterinária – UFMG/Belo Horizonte

<sup>9</sup>Pesquisador Embrapa Milho e Sorgo – Sete Lagoas/MG

<sup>10</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

**Resumo:** Objetivou-se avaliar a cinética de fermentação de três híbridos de milho, com diferentes idades de corte, pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. Os cultivares utilizados foram BRS 1035, BRS 1031 e BRS 1001, cortados no estágio de maturação leitoso, pastoso e farináceo. Nota-se redução no potencial máximo de produção de gases e aumento na taxa de produção de gases conforme o avanço da maturação do grão. Observa-se também aumento no tempo de colonização de acordo com a maturidade do grão. Os parâmetros cinéticos das silagens dos híbridos de milho foram influenciados pelo estágio de maturação dos grãos no momento do corte.

**Palavras-chave:** silagem, produção de gás, ruminante, milho.

**Abstract:** The aim was to evaluate the kinetics of fermentation of corn hybrids with different harvesting ages by semi-automatic *in vitro* gas production technique. The cultivars BRS 1035 BRS 1031 and BRS 1001 were harvest at three different maturation stages: milky, soft dough and floury. There were a reduction in the potential maximum gas production rate and increase in gas production with increasing maturation grain. It would also increase the colonization time according with mature grain. The kinetics parameters of silage of corn hybrids were influenced by stage of maturity of the grain at harvest.

**Keywords:** silage, gas production, ruminant, corn.

## **Introdução**

As silagens têm sido utilizadas na manutenção da produção animal para suprir as exigências nutricionais do rebanho, principalmente no período de entressafra em que boa parte das pastagens apresenta baixa produção de matéria seca e baixo valor nutricional. O milho tem se destacado entre as plantas forrageiras para produção de silagem por apresentar alta produção de matéria seca por hectare, além de bom balanço nutricional (MELLO et al., 1999).

O teor energético da silagem de milho pode variar com o híbrido plantado e a maturidade no momento da colheita. Dessa forma a escolha de híbridos de milho para a produção de silagem tem grande importância na obtenção de um produto economicamente viável e de alta qualidade. Características como, alta relação grão/massa verde e época de corte, propiciam maior produção de matéria seca e de grão, implicando numa silagem nutricionalmente mais rica (MELLO et al., 1999).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a cinética de fermentação de três híbridos de milho, com diferentes idades de corte, pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases.

## Material e Métodos

O ensaio de produção de gases *in vitro* foi realizado no laboratório da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/Minas Gerais. A silagem foi obtida de dois híbridos experimentais, BRS 1035 e BRS 1031, desenvolvidos pela Embrapa, e um híbrido comercial, BRS 1001, utilizado como testemunha, plantados nas dependências da Embrapa Milho e Sorgo. O material ensilado foi cortado manualmente, rente ao solo, em três estágios de maturação leitoso, pastoso e farináceo. Os híbridos foram picados em triturador forrageiro estacionário e ensilados em tambores metálicos com capacidade para 200 litros cada, revestidos internamente com sacos plásticos, compactados sob pisoteio e vedados com o auxílio de travas nas tampas.

Para a avaliação da cinética de fermentação ruminal foi utilizada a técnica semi-automática de produção de gases, segundo Theodorou et al. (1994). A produção de gases foi mensurada nos tempos: 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72, 96 horas após a incubação. A pressão originada pelos gases acumulados nos frascos foi medida através de um transdutor de pressão GE - DPI 705. A conversão dos valores de pressão de gases (x) para volume de gases (VG) foi estimada a partir da regressão linear,  $VG = -0,0171x^2 + 3,0926x + 0,0078$ , pré-estabelecida para as condições laboratoriais da Embrapa Gado de Leite.

A cinética da produção cumulativa de gases foi analisada empregando-se o modelo matemático unicompartimental de France et al (1993):  $Y = A \{1 - \exp [-b (t - L) - c * (\sqrt{t} - \sqrt{L})]\}$ , em que: Y, produção cumulativa de gases (mL); A, potencial máximo de produção de gases; L, tempo de colonização (lag time); b(h-1) e c (h-0, 5), taxas fracionais constantes;  $\mu$ , taxa de produção de gases (h-1); t, tempo de incubação em horas.

## Resultados e Discussão

Na Tabela 1, encontram-se os parâmetros de produção de gases estimados pelo modelo de France et al. (1993). Nota-se redução no potencial máximo de produção de gases (A), com o avançar da maturidade dos grãos para os híbridos BRS 1035 e BRS 1031, fato provavelmente ligado ao aumento da concentração de amido, o qual é fermentado preferencialmente a propionato cujo processo metabólico resulta em diminuição da produção de gás. No entanto, quando comparado o potencial máximo de produção de gás entre os híbridos em um mesmo estágio de maturação os valores encontrados foram semelhantes. No que diz respeito ao híbrido BRS 1001, não foi observado o mesmo efeito, uma vez que para o estágio de maturação pastoso o potencial máximo de produção de gás foi menor do que esperado, o que pode estar relacionado com a perda de grãos durante o processo de maturação.

Os potenciais máximos de produção de gases variaram de 259, 32 mL/g MS a 279, 96 mL/g MS, nas silagens avaliadas. Os valores encontrados no presente trabalho foram superiores aos observados por Faria et al. (2008) e Magalhães et al. (2006), que avaliaram silagens de milho e sorgo, respectivamente. Faria et al. (2008) encontrou um potencial de produção de gases de 249,58 mL/g MS, enquanto Magalhães et al. (2006) observou uma variação de 224 mL/g MS a 231 mL/g MS.

**Tabela 1.** Produção cumulativa de gases e parâmetros de produção de gases estimados, pelo modelo de France et al. (1993), das silagens de três híbridos de milho em três estágios de maturação.

Híbridos	Idade Corte	A (mL)	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Lag (h: min.)	R <sup>2</sup>
BRS 1035	Leitoso	276,18	0,0292	0:06	0,97
BRS 1035	Pastoso	272,25	0,0361	0:27	0,98
BRS 1035	Farináceo	259,32	0,0447	1:20	0,97
BRS 1031	Leitoso	279,96	0,0349	0:06	0,94
BRS 1031	Pastoso	273,09	0,0426	1:08	0,97
BRS 1031	Farináceo	261,02	0,0346	0:54	0,95
BRS 1001	Leitoso	275,65	0,0337	0:06	0,98
BRS 1001	Pastoso	261,27	0,0441	0:51	0,97
BRS 1001	Farináceo	262,88	0,0545	1:51	0,98

A – Potencial máximo de produção de gases,  $\mu$  – Taxa de produção de gases, LAG – Tempo de colonização.

A taxa de produção de gás aumentou com o avançar do estágio de maturação para os híbridos BRS 1035 e BRS 1001, o que sugere que o aumento da concentração de amido fornece substratos mais prontamente fermentáveis acelerando a degradação. O potencial máximo de produção de gás, porém, não é diretamente proporcional a taxa de produção de gás, uma vez que a fermentação do amido ocorre à propionato, cuja via metabólica resulta em captura de H<sub>2</sub>, não formação de CO<sub>2</sub> e consequentemente produção de gás. No entanto, não foi observado o mesmo efeito para o híbrido BRS 1031, o qual apresentou maior taxa de produção de gás e maior tempo de colonização.

O tempo de colonização (*lag time*) é um parâmetro que está relacionado com a degradação da fração fibrosa (MIZUBUTI et al., 2011). O avançar da época da ensilagem do grão foi acompanhado pela elevação do L, o que provavelmente está associado à diminuição dos teores de substratos prontamente fermentáveis e modificações da estrutura da parede celular dificultando o acesso microbiano.

## Conclusões

Os parâmetros cinéticos das silagens dos híbridos de milho foram influenciados pelo estágio de maturação dos grãos no momento do corte.

## Agradecimentos

Ao CNPq

## Literatura Citada

FARIA, B.N et al. Efeitos da adição de propilenoglicol ou monensina à silagem de milho sobre a cinética de degradação dos carboidratos e produção cumulativa de gases *in vitro*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.4, p.896-903, 2008.

FRANCE, J. et al. A model to interpret gas accumulation profiles associated with *in vitro* degradation of ruminal feeds. **Journal of Theoretical Biology**, vol. 163, p. 99-111 1993.

MAGALHÃES, R.T. et al. Avaliação de quatro genótipos de sorgo pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. **Revista Brasileira de Milho e Sorgo**, v.5, n.1, p.101-111, 2006.

MIZUBUTI, I.Y. et al. Cinética de fermentação ruminal *in vitro* de alguns coprodutos gerados na cadeia produtiva do biodiesel pela técnica de produção de gás. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, suplemento 1, p. 2021-2028, 2011.

MELO, W.M. et al. Avaliação de cultivares de milho para produção de silagem na região de Lavras – MG. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.23, n.1, p.31-39, Jan./mar., 1999.

THEODOROU, M.K. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminal feeds. **Animal Feed Science and Technology**, vol. 48, n. 34, p. 185-197, 1994

**Efeito dos extratos de *Baccharis dracunculifolia*, *Aristolochia cymbifera* Mart. e *Piper aduncum* e, da alga *Lithothamnium* sp. na cinética de fermentação e produção de metano**  
**Effects of extract of *Baccharis dracunculifolia*, *Aristolochia cymbifera* Mart. and *Piper aduncum* and, seaweed *Lithothamnium* sp on fermentation kinetics and methane production**

Larissa Gomes dos Reis<sup>1</sup>, Ellen de Almeida Moreira<sup>2</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>3</sup>, Ademir Alves da Silva Filho<sup>4</sup>, Mirton José Frota Morenz<sup>3</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>3</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Farmácia – UFJF- Bolsista PIBIC/CNPq email: larissagomesreis@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Biomédica. Bolsista DTI 3/CNPq

<sup>3</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite.

<sup>4</sup>Professor Universidade Federal de Juiz de Fora.

**Resumo:** O objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia*, *Aristolochia cymbifera* Mart. e *Piper aduncum* e, da alga *Lithothamnium* sp na cinética de fermentação ruminal *in vitro* e produção de metano. Foram avaliadas as concentrações de 30, 300 e 3.000 ppm dos extratos e de 1, 5 e 10% de alga. Após obtenção do extrato alcoólico as amostras foram submetidas à avaliação da cinética de fermentação ruminal e produção de metano por meio da técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases. A inclusão de extrato não gerou alterações significativas na cinética de fermentação enquanto a alga reduziu o potencial máximo de produção gases. A adição de *Aristolochia cymbifera* reduziu a produção de metano, destacando-se como possível agente mitigador a ser estudado em ensaios *in vivo*.

**Palavras-chave:** extrato alcoólico, produção de gases, taxa de degradação.

**Abstract:** The aim of the study was to evaluate the effect of *Baccharis dracunculifolia*, *Aristolochia cymbifera* Mart. and *Piper aduncum* and, seaweed *Lithothamnium* sp on fermentation kinetics and methane production. It was evaluated the concentrations of 30, 300 and 3.000 ppm of extracts and 1, 5 and 10% of seaweed. The alcoholic extract of samples were analysed regarding on fermentation kinetics and methane production by the semi-automated *in vitro* gas production technique. The extract inclusion do not affect the fermentation kinetics, although the seaweed decreased the total gas production. The methane production were decreased on *Aristolochia cymbifera* presence, which is highlighted as a possible mitigator agent.

**Keywords:** alcoholic extract, degradation rate, gas production.

## **Introdução**

As preocupações a cerca da emissão de gases efeito estufa (GEE) por ruminantes têm aumentado atualmente devido ao impacto negativo sobre a biodiversidade e a economia do planeta. O metano é um dos produtos de fermentação de carboidratos no rúmen, e apresenta potencial de aquecimento global cerca de 23 vezes maior do que o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (KAMRA et al, 2006). A formação do metano além de gerar efeitos ambientais negativos representa para o animal perda de 2 a 15% da energia bruta ingerida, afetando diretamente o sistema de produção de ruminantes.

As plantas produzem diversos metabólitos secundários, os quais atuam na proteção contra insetos e agentes microbianos. Esses compostos podem apresentar efeitos seletivos e interferir na modulação da população microbiana do rúmen, melhorando

o metabolismo do nitrogênio e reduzindo a produção de metano (PATRA e SAXENA, 2010).

A alga *Lithothamnium calcareum* pertence ao grupo das algas vermelhas ou rodofíceas, da família das *Coralineaceae*, possui aspecto calcário e é rica em carbonato de cálcio e magnésio. Nos países europeus sua utilização na alimentação animal vem sendo praticada há mais de 200 anos como suplemento mineral enquanto que no Brasil o uso se restringe a agricultura. Nos últimos anos, o lançamento de produtos a base de *Lithothamnium* sp como suplemento em rações para animais, vem despertando o interesse de pesquisas.

Assim, nesse trabalho objetivou-se avaliar o efeito de três concentrações de extrato alcoólico de *Baccharis dracunculifolia*, *Aristolochia cumbifera* Mart. e *Piper aduncum* e da alga marinha *Lithothamnium* sp na cinética de fermentação ruminal *in vitro* e produção de metano.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido na Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora – MG. Foi utilizada amostra de *Brachiaria brizantha* como controle. Foi avaliado o efeito de três concentrações (30, 300 e 3.000 ppm) de extrato alcoólico das partes aéreas de *Baccharis dracunculifolia*, do caule de *Aristolochia cymbifera* Mart. e do fruto de *Piper aduncum* e de três concentrações (1, 5 e 10%) da alga marinha do gênero *Lithothamnium* sp. O material vegetal foi coletado no horto de plantas medicinais da Faculdade de Farmácia-UFJF em agosto de 2011. Após a separação das folhas, raízes, frutos e casca, os materiais vegetais foram submetidos à secagem em estufa de ar quente e circulante a 40 °C, durante 48 horas. Após secagem, os materiais vegetais foram submetidos à moagem para fornecer pó fino. Os pós de cada material vegetal foram submetidos à maceração por período de 72 horas em solução hidroalcoólica (etanol: água 96:4 v/v) seguido de filtração, sendo que este processo foi repetido até esgotamento do material vegetal. As soluções hidroalcoólicas obtidas foram concentradas em rotaevaporador à temperatura de  $45 \pm 5$  °C, para obtenção dos extratos brutos. Os extratos foram adicionados aos frascos de fermentação antes da inoculação do líquido ruminal, e a alga foi pesada junto ao substrato para avaliação do processo fermentativo.

Para a avaliação da cinética de fermentação ruminal e produção de metano foi utilizada a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases, segundo Maurício et al. (1999). A produção de gases foi mensurada 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72, 96 horas após a incubação. A medição dos gases foi realizada com transdutor de pressão (DPI 705) e a conversão dos valores de libra por polegada quadrada (PSI) em volume foi realizada a partir da equação  $\text{Volume} = -0,0171 \text{ pressão}^2 + 3,0926 \text{ pressão} + 0,0078$ ;  $R^2 = 0,9877$ , estabelecida para as condições locais do laboratório. No tempo de 24 hs foram coletadas amostras de gases em *exetainers* para a determinação da concentração de metano em cromatógrafo a gás.

Adotou-se o modelo unicompartmental descrito por France et al. (1993) para a descrição da dinâmica de fermentação *in vitro* ruminal. Para a avaliação da produção de metano foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 4 x 3 (Substratos x doses) com duas repetições e os valores médios das diferentes doses de extrato e alga foram comparadas por meio do teste de Scott Knot ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Os parâmetros da cinética de fermentação ruminal e produção de metano encontram-se na Tabela 1. A inclusão de extratos não gerou alterações perceptíveis na cinética de fermentação ruminal. No que diz respeito à adição da alga observa-se que provavelmente devido ao substrato ser rico em minerais, os quais não são fermentados, sua inclusão não contribui para a produção de gases. Os resultados encontrados (184,0; 178,8 e 179,2 mL/g) foram menores comparados ao controle *Brachiaria brizantha* (192,1mL/g). Estudos com foco na biodisponibilidade dos elementos minerais para

ruminantes em condições brasileiras podem ser importantes para evidenciar a viabilidade de uso deste tipo de algo na formulação de dietas.

**Tabela 1.** Parâmetros da cinética de fermentação ruminal e produção de metano de *Brachiaria brizantha* acrescidas de níveis crescentes de extrato de *Aristolochia cymbifera* Mart., *Piper aduncum*, *Baccharis dracunculifolia* e alga *Lithothamnium* sp.

Tratamento	Concentração	A	$\mu$	L	CH <sub>4</sub>
<i>Brachiaria brizantha</i> (controle)	-	192,1	0,023	2hs:57min	3,49 <sup>B</sup>
	30 ppm	181,7	0,024	3hs:06min	2,99 <sup>B</sup>
<i>Aristolochia cymbifera</i>	300 ppm	183,8	0,021	2hs:14min	1,93 <sup>A</sup>
	3000 ppm	192,2	0,021	1hs:48min	2,59 <sup>A</sup>
<i>Piper aduncum</i>	30 ppm	186,4	0,022	3hs:17min	3,06 <sup>B</sup>
	300 ppm	186,0	0,021	1hs:52min	4,68 <sup>C</sup>
	3000 ppm	184,7	0,025	2hs:23min	6,09 <sup>C</sup>
<i>Baccharis dracunculifolia</i>	30 ppm	173,7	0,022	1hs:23min	5,52 <sup>C</sup>
	300 ppm	205,0	0,024	2hs:27min	6,39 <sup>C</sup>
	3000 ppm	191,1	0,024	2hs:47min	5,86 <sup>C</sup>
<i>Lithothamnium</i> sp.	1 %	184,0	0,020	3hs:51min	3,81 <sup>B</sup>
	5 %	178,8	0,019	4hs:22min	3,52 <sup>B</sup>
	10 %	179,2	0,020	4hs:35min	3,41 <sup>B</sup>

A: volume total de gás produzido;  $\mu$ : taxa de degradação dos CNF; L: tempo de colonização, *lag time*  
 Letras diferentes indicam diferença significativa (P<0,05)

A produção de metano foi menor com a inclusão do extrato de *Aristolochia cymbifera* nas concentrações de 300 e 3.000 ppm. Tal efeito pode ter ocorrido devido a modificações que os metabólitos secundários presentes no extrato causaram nos processos fermentativos, que podem ter alterado as proporções dos ácidos orgânicos e, consequentemente a produção de metano.

## Conclusões

O extrato de *A. cymbifera* apresentou potencial de uso como agente mitigador de metano, o qual deve ser verificado em testes *in vivo*.

## Agradecimentos

A CNPq.

## Literatura Citada

- FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K. et al. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. **J. Theor. Biol.**, v.163, p.99-111, 1993
- KAMRA, D.N., NEETA AGARWAL, CHAUDHARY, L.C. Inhibition of ruminal methanogenesis by tropical plants containing secondary compounds. **International Congress Series**, v. 1293, p. 156–163, 2006.
- MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.
- PATRA, A.K., SAXENA, J. A new perspective on the use of plant secondary metabolites to inhibit methanogenesis in the rumen. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1198–1222, 2010.



# **Cinética de fermentação *in vitro* de silagem de sorgo em diferentes idades de corte**

## **In vitro ruminal fermentation kinetics of sorghum silage at different harvest age**

Larissa Gomes dos Reis<sup>1</sup>, Tainá Silvestre<sup>2</sup>, Thierry Ribeiro Tomich<sup>3</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>3</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>3</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>3</sup>, José Avelino Santos Rodrigues<sup>4</sup>, Lúcio Carlos Gonçalves<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Granduanda em Farmácia – UFJF. Bolsista CNPq/PIBIC. email: larissagomesreis@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal – USP/Pirassununga. e-mail: taina.tr@gmail.com

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite

<sup>4</sup>Embrapa Milho e Sorgo

<sup>5</sup>Escola de Veterinária/UFMG

**Resumo:** O objetivo do trabalho foi avaliar os parâmetros da cinética de degradação ruminal das silagens de sorgo, pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. O material para ensilagem foi cortado aos 114, 121, 128 e 135 dias de idade. A produção cumulativa de gases não diferiu entre as silagens nos diferentes estágios de maturação. O volume de gases dos carboidratos não fibrosos (CNF) aumentou assim como o tempo de colonização, enquanto o volume de gases oriundos da fermentação da fração fibrosa e a taxa de degradação de CNF reduziram com o avançar do estágio de maturação. Recomenda-se a ensilagem do sorgo BRS 506 quando as plantas apresentarem de 121 a 128 dias de idade.

**Palavras-chave:** conservação de forragem, produção de gás, taxa de degradação.

**Abstract:** The aim of the study was to evaluate the ruminal degradation kinetics parameters of sorghum silage, by semi-automated *in vitro* production technique. Material for ensiling process was harvested at 114, 121, 128 and 135 days of age. The cumulative gas production did not differ among the different maturation stages. The gas volume of soluble carbohydrate and colonization time increased, while the gas volume of fibrous fraction and soluble carbohydrate degradation rate decreased according with the maturation stage. It is recommended to use the material harvested between the 121 and 128 days of age for sorghum variety BRS 506.

**Keywords:** forage conservation, degradation rate, gas production.

## **Introdução**

A intensificação dos processos produtivos na pecuária de corte e de leite nacional promoveu aumento das necessidades quantitativas e qualitativas de alimentos para os animais, principalmente nos períodos de escassez de pastagens. Nesse aspecto, a produção de silagem de alta qualidade torna-se uma alternativa viável à manutenção dos sistemas de forrageamento, por restringir o período de carência alimentar e contribuir para a melhora dos índices zootécnicos do rebanho bovino nacional (MACHADO et al., 2011). A qualidade nutricional de uma forrageira é medida por sua digestibilidade e pelo consumo voluntário. No entanto, as avaliações desses parâmetros *in vivo* são técnicas laboriosas, caras e demoradas, que dificultam a avaliação de alimentos. A técnica de produção de gases *in vitro* é importante no estudo dos parâmetros cinéticos das frações que compõem os alimentos, pois reflete a taxa e a extensão em que os componentes são fermentados pelos microrganismos do rúmen (CABRAL et al., 2002).

## Material e Métodos

O híbrido de sorgo BRS 506 foi cultivado, colhido e ensilado na Embrapa Milho e Sorgo no ano agrícola de 2010/2011. Os cortes foram realizados nas idades de 114, 121, 128 e 135 dias após o plantio. Foi utilizado o delineamento experimental de blocos ao acaso, com quatro épocas de corte e cinco repetições, sendo os blocos constituídos por cinco parcelas no campo contendo todas as épocas de corte cada uma. O material foi cortado manualmente rente ao solo, imediatamente picado em picadeira estacionária, amostrado de forma homogênea e ensilado em silos experimentais fechados com tampa de PVC dotadas de válvula do tipo Bunsen. A abertura dos silos foi realizada aos 56 dias de fermentação. Amostras das silagens foram pré-secas a 55 °C por 72 horas, moídas a 1 mm e armazenadas para posterior avaliação pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases.

O ensaio *in vitro* de produção de gases foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite. Nos frascos, foram previamente adicionados, aproximadamente, 500 mg de amostra moída (1 mm) e 28,2 mL de meio de cultura tamponado (THEODOROU et al., 1994), sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Os frascos foram vedados com rolha de butil e, para evitar contaminação e/ou fermentação antes da adição do inóculo ruminal, os frascos foram mantidos em geladeira a 4 °C. Cinco horas antes da inoculação com líquido ruminal, os mesmos foram colocados em sala climatizada a 39 °C. A coleta do líquido ruminal foi realizada manualmente em vaca F1 Holandês x Gir, não lactante, provida de cânula ruminal. O líquido ruminal foi transportado para o laboratório em garrafa térmica pré-aquecida com água a 39 °C. No laboratório, o inóculo foi filtrado em dupla camada de gaze sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Nos frascos contendo amostra e meio de cultura foram adicionados 3,2 mL do inóculo (líquido ruminal). Posteriormente, os frascos foram vedados com rolha de butil sobre atmosfera de CO<sub>2</sub>, lacrados com anilhas de alumínio e deixados em sala climatizada a 39 °C sob mesa agitadora orbital. A produção de gases foi mensurada nos tempos 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96 horas após a incubação. A leitura do volume de gases foi realizada por meio de aparato de vaso comunicante.

Os dados da cinética da produção cumulativa de gases foram ajustados empregando-se o modelo logístico bicompartimental descrito por Schofield et al. (1994).

## Resultados e Discussão

Não foi observada variação significativa na produção de gases entre os estádios de maturação para o mesmo período de incubação (Tabela 1). Comparando os períodos de incubação para um mesmo estágio de maturação observa-se produções acumuladas de gases crescentes até 96 h de incubação.

**Tabela 1.** Produção cumulativa de gases (mL/g de MS) após os tempos de incubação em silagem do sorgo BRS 506, em função das idades de corte.

Idade	Tempos de incubação (horas)														
	2	4	6	8	10	12	14	17	20	24	28	34	48	72	96
114	27,8	43,1	55,3	64,4	70,7	76,5	81,4	90,9	98,6	110,1	120,3	134,2	154,7	168,8	177,6
121	27,8	44,0	58,7	69,7	76,6	82,9	88,6	98,9	107,1	119,0	129,1	142,4	161,4	173,6	181,7
128	23,8	38,8	54,1	66,1	73,8	81,0	86,7	96,5	103,8	114,1	123,2	135,5	152,4	162,3	169,5
135	27,6	45,1	60,9	73,0	80,8	88,4	94,6	105,5	113,3	124,1	133,4	144,7	161,4	171,6	178,5

Houve aumento do volume de produção de gases dos carboidratos não fibrosos (VCNF) em função das idades de corte do sorgo, provavelmente devido ao acúmulo de amido nos grãos (CNF), o qual possui elevada degradabilidade ruminal, contribuindo com energia a ser utilizada pelos microrganismos ruminais. Observa-se na Tabela 2 que, com o avanço da maturidade, houve redução na taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos (kCNF). Isso pode ser justificado, pelo menor acesso das bactérias amilolíticas aos grânulos de amido presente no grão de sorgo, dificultando a degradação microbiana e,

consequentemente, sua digestão, corroborando com os resultados de Faria Junior et al. (2010).

**Tabela 2.** Volume de produção de gases e taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos (VCNF e kCNF), tempo de colonização (TC) e volume de produção de gases e taxa de degradação dos carboidratos fibrosos (VCF e kCF) da silagem de sorgo, em função das idades de corte.

Idade	VCNF	kCNF	TC	VCF	kCF
114	43,33	0,122	0:57	130,43	0,021
121	50,26	0,119	1:22	127,32	0,022
128	53,75	0,112	1:35	112,05	0,022
135	59,48	0,107	2:31	115,1	0,023

O tempo de colonização (TC) é um parâmetro importante e se relaciona com a degradação da fração fibrosa. Pode-se observar que os TC variaram de 0:57 minutos a 2 horas, com os menores tempos verificados para as silagens produzidas entre 114 dias (0:57 minutos) e 121 dias (1:22), momento em que se observa aumento da fração de panícula e boa qualidade da fibra das folhas. Entretanto, com o avanço da maturidade das plantas observa-se elevação nos tempos de colonização (FARIA JÚNIOR et al., 2010). O volume de produção de gases dos carboidratos fibrosos (VCF) apresentados na Tabela 2, demonstra que o processo de lignificação das partes da planta de sorgo pode ser o responsável pela menor produção de gases nos estádios mais avançados de maturação. A taxa de degradação dos carboidratos fibrosos (kCF) não foi afetada em função das idades de corte.

## Conclusões

Para a confecção de silagens utilizando-se o sorgo híbrido BRS 506, recomenda-se o corte entre as idades de 121 a 128 dias.

## Agradecimentos

A CNPq.

## Literatura Citada

CABRAL, L. S.; VALADARES FILHO, S. C.; DETMANN, E. et al. Cinética ruminal das frações de carboidratos, produção de gás, digestibilidade *in vitro* da matéria seca e NDT estimado da silagem de milho com diferentes proporções de grãos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 6, p. 2332-2339, 2002.

FARIA JUNIOR, W. G.; GONÇALVES, L. C.; MAURÍCIO, R. M. et al. Avaliação das silagens de sorgo BRS-610 em sete estádios de maturação pela técnica *in vitro* semiautomática de produção de gases. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 4, p. 898-905, 2010.

SILVA, L. R. N. V.; OLIVEIRA, R. L.; CARVALHO, G. G. P. et al. Degradabilidade ruminal e balanço energético em vacas leiteiras a pasto suplementadas com torta de dendê. **Revista Brasileira de Saúde Produção Animal**, v. 13, n. 2, p. 503-515, 2012.

MACHADO, F. S.; RODRÍGUEZ, N. M.; GONÇALVES, L. C. et al. Consumo e digestibilidade aparente de silagens de sorgo em diferentes estádios de maturação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6 p. 1470-1478, 2011.

SCHOFIELD, P., PITT, R. E., PELL, A. N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.

THEODOROU, M. K.; WILLIAMS, B. A.; DHANOA, M. S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science Technology**. v. 48, n. 1, p.185-197, 1994.

# Cinética de fermentação de silagem de milho com adição de glicerina bruta

## Fermentation kinetics of corn silage with addition of crude glycerine

Larissa Gomes dos Reis<sup>1</sup>, Almira Biazon França<sup>2</sup>, Tainá Silvestre<sup>3</sup>, Ellen de Almeida Moreira<sup>4</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>5</sup>, Mirton José Frota Morenz<sup>5</sup>, Jackson Oliveira e Silva<sup>5</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>5</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Granduanda em Farmácia – UFJF. Bolsista CNPq/PIBIC. e-mail: larissagomesreis@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UFRRJ/Seropédica. e-mail: almirabiazon@gmail.com

<sup>3</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Nutrição e Produção Animal – USP/Pirassununga. e-mail: taina.tr@gmail.com

<sup>4</sup>Biomédica – Bolsista DTI/CNPq. email: helllem@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite com objetivo de testar os efeitos da inclusão de 0, 5, 10 e 15% de glicerina bruta (base da MN) na silagem de milho sobre a cinética de fermentação ruminal *in vitro*. Foi utilizada a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases ajustadas a um modelo bicompartimental. A adição deste coproduto aumentou as taxas de degradação dos carboidratos não fibrosos e fibrosos, bem como a digestibilidade *in vitro* da matéria seca, volume total de gases e redução do tempo médio de digestão, indicando influência positiva da inclusão de glicerina bruta na silagem do milho.

**Palavras-chave:** coproduto, produção de gás, taxa de degradação.

**Abstract:** The experiment was carried out in the laboratory of Microbiology of the Rumen of Embrapa Dairy Cattle to evaluate the effects of crude glycerin inclusion of 0, 5, 10 and 15% (base of MN) in corn silage on the kinetics of *in vitro* ruminal fermentation. The technique used was the *in vitro* semi-automatic gas production adjusted to a bicompartimental model. The addition of this byproduct increased the degradation rates of the fiber and non-fiber carbohydrates, as well as the *in vitro* digestibility of dry matter, total volume of gas produced and decreased the average digestion time. These findings indicate a positive effect of crude glycerin inclusion in corn silage.

**Keywords:** byproduct, degradation rate, gas production.

## Introdução

A alimentação dos animais representa o maior custo da atividade pecuária, sobretudo quando se utiliza fonte suplementar como o milho, que, apesar da elevada qualidade nutricional, apresenta, em geral, alto custo, tornando necessária a utilização de fontes alimentares alternativas com melhor relação custo/benefício e que não concorram diretamente com a alimentação humana (SILVA et al., 2005). A utilização de coprodutos tem sido considerada uma alternativa promissora para alimentação de ruminantes, devido aos aspectos qualitativos relacionados às suas composições químico-bromatológicas, além do seu baixo custo e estabilidade de oferta (SILVA et al., 2012). No entanto, as informações relacionadas à adição de glicerina bruta durante o processo de ensilagem são escassas e podem ser uma forma potencial para viabilizar o uso da glicerina para a alimentação de vacas leiteiras. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a cinética de fermentação de silagens de milho contendo diferentes níveis de glicerina bruta.

## Material e Métodos

Quatro silos experimentais com capacidade para 10 toneladas foram enchidos com forragem de milho à qual foi adicionada 0, 5, 10 ou 15% de glicerina co-produto do biodiesel (87% de MS e 86% de glicerol). Após 40 dias de fermentação os silos foram abertos e seu conteúdo fornecido a vacas em lactação. Amostras da silagem eram coletadas semanalmente de cada silo e armazenadas em freezer. Após 12 semanas as mesmas foram descongeladas e usadas para fazer uma amostra composta para cada tratamento. Tais amostras foram secas em estufa de ventilação forçada a 55 °C durante 72 h, moídas em moinho dotado de peneira de 1 mm e utilizadas no ensaio de produção de gases.

O ensaio *in vitro* de produção de gases foi conduzido no Laboratório de Microbiologia do Rúmen da Embrapa Gado de Leite. Nos frascos, foram previamente adicionados, aproximadamente, 300 mg de amostra moída (1 mm) das silagens (com as concentrações 0, 5, 10 e 15% de glicerina) e 28,2 mL de meio de cultura tamponado (THEODOROU et al., 1994), sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Os frascos foram vedados com rolha de butil e, para evitar contaminação e/ou fermentação antes da adição do inóculo ruminal, os frascos foram mantidos em geladeira a 4 °C. Cinco horas antes da inoculação com líquido ruminal, os mesmos foram colocados em sala climatizada a 39 °C.

O inóculo utilizado foi coletado manualmente e proveniente de três vacas F<sub>1</sub> Holandesa x Gir, não lactantes, dotadas de cânula ruminal, alimentadas com silagem de milho. O líquido ruminal foi transportado para o laboratório em garrafa térmica pré-aquecida com água a 39 °C. No laboratório, os inóculos foram filtrados em dupla camada de gaze sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Nos frascos contendo amostra e meio de cultura foram adicionados 3,2 mL do inóculo (líquido ruminal). Posteriormente, os frascos foram vedados com rolha de butil sobre atmosfera de CO<sub>2</sub>, lacrados com anilhas de alumínio e deixados em sala climatizada a 39 °C sob mesa agitadora orbital. A produção de gases foi mensurada nos tempos 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96 horas após a incubação. A leitura do volume de gases foi realizada por meio de aparato de vaso comunicante, de acordo com Fedorah & Hrudey, 1983.

Os dados da cinética da produção cumulativa de gases foram ajustados empregando-se o modelo logístico bicompartimental descrito por Schofield et al. (1994). Para verificar a necessidade ou não de transformação dos dados fez-se análise da distribuição da normalidade dos resíduos (Shapiro-Wilk; P<0,10). Posteriormente, os dados foram submetidos à análise de variância, e as médias estudadas por meio de análise de regressão, utilizando-se o teste t ( $\alpha=0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Houve efeito ( $p<0,05$ ) da inclusão de glicerina bruta sobre as taxas de degradação ( $k_d$ CNF e  $k_d$ CF), o volume total de gás (VT), a digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e tempo médio de digestão (TMD) (Tabela 1).

**Tabela 1.** Taxas de degradação para as frações de carboidratos não fibrosos (kdCNF) e fibrosos (kdCF), volume total de gás (VT), digestibilidade *in vitro* da matéria seca (DIVMS) e o tempo médio de digestão (TMD) de silagens com níveis crescentes de glicerina.

Variáveis	Inclusão de glicerina (%)				Regressão	R <sup>2</sup>	CV
	0	5	10	15			
K <sub>d</sub> CNF	0,0728	0,0760	0,0807	0,0828	$\hat{Y} = 0,0729 + 6,9 \times 10^{-4} \times G$	0,98	4,0
K <sub>d</sub> CF	0,0161	0,0174	0,0185	0,0198	$\hat{Y} = 0,0162 + 2,4 \times 10^{-4} \times G$	0,99	3,7
VT	221,3	239,5	244,1	253,0	$\hat{Y} = 224,5 + 1,9972 \times G$	0,93	1,1
DIVMS	63,40	69,52	71,72	77,01	$\hat{Y} = 63,96 + 0,8605 \times G$	0,97	3,1
TMD	78,04	72,64	69,43	66,04	$\hat{Y} = 77,42 - 0,7842 \times G$	0,98	2,9

As taxas de degradação dos CNF e CF aumentaram linearmente em função dos níveis de glicerina adicionado a silagem de milho. Embora Paggi et al. (2004), em estudos

*in vitro*, tenham demonstrado diminuição da atividade celulolítica em função do aumento das concentrações de glicerol no rúmen, tal fato não foi observado no presente trabalho.

Houve aumento significativo no volume total de gás (VT) com o aumento da inclusão de glicerina na dieta. Tal fato sugere que, a inclusão de glicerina, além de reduzir o teor de FDN da silagem, aumentou a fermentação da fração fibrosa e, consequentemente, a produção de gases decorrente da fermentação dessa fração.

Observou-se, também, efeito significativo dos níveis de inclusão de glicerina sobre os valores de DIVMS. Silagens aditivadas com 15% de glicerina bruta apresentaram 77,07% de DIVMS.

Houve redução linear do TMD em função dos níveis crescentes de glicerina. Este resultado foi coerente com as elevadas taxas de digestibilidade encontradas neste trabalho.

## Conclusões

A inclusão de glicerina à silagem de milho melhorou os parâmetros de fermentação ruminal, aumentando as taxas de degradação das frações CNF e CF, bem como a DIVMS e o VT, e causando uma redução linear do TMD.

## Literatura Citada

FEDORAH, P.M.; HRUDEY, S.E. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. **Environ. Technol. Lett.**, v.4, p. 425-432, 1983.

PAGGI, R.A.; FAY, J.P.; FAVERIN, C. In vitro ruminal digestibility of oat hay and cellulolytic activity in the presence of increasing concentrations of short-chain acids and glycerol. **Journal of Agricultural Science**, v.142, p.89-96, 2004.

SILVA, H.G.O.; PIRES, A.J.V.; SILVA, F.F. et al. Farelo de cacau (*Theobroma cacao* L.) e torta de dendê (*Elais Guineensis* Jacq.) na alimentação de cabras em lactação: consumo e produção de leite. **Rev. Bras. Zootec.**, v.34, n.5, p.1786-1794, 2005.

SILVA, L.R.N.V.; OLIVEIRA, R.L.; CARVALHO, G.G.P. et al. Degradabilidade ruminal e balanço energético em vacas leiteiras a pasto suplementadas com torta de dendê. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, v.13, n.2, p.503-515, 2012.

SCHOFIELD, P., PITT, R.E., PELL, A.N. 1994. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **J. Anim Sci.**, v.72, n. 11, p.2980-2991.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science Technology**. v. 48, n. 1, p.185-197, 1994.

# Macrofauna do solo em sistema de integração lavoura-pecuária

Renata do Amaral Rangel<sup>1</sup>, Juliana Amorim Fonseca<sup>2</sup>, Carlos Renato Tavares de Castro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Acadêmica de Ciências Biológicas, CES/JF (Juiz de Fora – MG), Bolsista de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora – MG, e-mail: rejfrangel@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Bióloga, CES/JF (Juiz de Fora – MG), e-mail: juamorimf@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora – MG), e-mail: castro@cnpgl.embrapa.br

**Resumo:** A integração lavoura-pecuária é considerada uma boa técnica para recuperar as propriedades físicas do solo. A fauna do solo, componente fundamental na ciclagem de nutrientes, é sensível às práticas de manejo inadequadas. Dessa forma, os invertebrados edáficos são bons indicadores de mudanças ocorridas no ambiente. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a diversidade e as riquezas total e média da fauna do solo em um sistema de integração lavoura-pecuária, na estação chuvosa (outubro de 2010 a fevereiro de 2011). O experimento foi conduzido no Sítio do Valão, em Mar de Espanha – MG. Foram coletadas 45 amostras de solo nas seguintes áreas: cultivo de milho estabelecido há dois anos, pastagem estabelecida há dois anos e em fragmento da mata secundária. Posteriormente foram isolados 196 indivíduos, divididos em 12 grupos taxonômicos, distribuídos em Classe, Ordem ou Família. O fragmento de mata secundária apresentou os maiores índices de distribuição relativa, de diversidade e de riquezas. As outras duas áreas também apresentaram valores significativos desses índices. Dessa forma, os sistemas de integração lavoura-pecuária podem contribuir para a sustentabilidade do solo, tendo em vista que, a rotação de culturas possui potencial para melhorar suas propriedades.

**Palavras-chave:** fauna do solo, integração lavoura-pecuária-floresta, sustentabilidade.

**Abstract:** The crop-livestock integration is considered a good technique to recover the physical properties of soil. The soil fauna, a key component in nutrient cycling, is sensitive to inappropriate management practices. Thus, edaphic invertebrates are good indicators of environmental changes. The objective of this study was to evaluate the diversity and richness of a soil fauna in a system of crop-livestock integration, in the rainy season (October, 2010 to February, 2011). The essay was conducted at Sítio Valão, Mar de Espanha, Minas Gerais State. 45 soil samples were collected in the following areas: maize crop, that has been established for two years, a two years old pasture and secondary forest fragment. 196 individuals were subsequently isolated, divided into 12 taxa, distributed in Class, Order or Family. The fragment of secondary forest had the highest rates of relative distribution, diversity and richness. The other two areas also showed significant values for these indices. Thus, systems of crop-livestock integration can contribute to soil sustainability, given that the crop rotation has the potential to improve their properties.

**Keywords:** Soil fauna; crop-livestock-forest integration; sustainability.

## Introdução

Em sistemas de produção que envolvem pecuária e agricultura, a degradação física do solo na forma de compactação, causada pelo pisoteio dos animais tem sido a principal causa de redução de rendimento das lavouras (SPERA et al., 2006).

Os sistemas de integração lavoura-pecuária (ILP) possuem potencial para manter a biodiversidade florística, também contribuindo para diversos processos ecológicos. Nesses sistemas de uso do solo as atividades agrícolas e pecuárias são combinadas no mesmo espaço e no tempo. Dessa forma, aproveitam-se as interações ecológicas entre animais e



cultivos agrícolas no sentido de contribuir para aumentar a produtividade e, ao mesmo tempo, proteger o solo e aumentar a ciclagem de nutrientes (MÜLLER et al., 2010).

A macrofauna do solo é sensível ao manejo que lhe é imposto e Manhães et al. (2007) preconizam que alterações na densidade e diversidade desses animais sejam reflexos das interações impostas na cobertura vegetal constituindo-se, portanto, um bom indicador das mudanças ocorridas no ambiente edáfico.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade e as riquezas total e média da fauna do solo em um sistema de integração lavoura-pecuária.

## Material e Métodos

Foram selecionadas duas áreas do Sítio do Valão, no município de Mar de Espanha, MG que vem sendo manejadas segundo as técnicas preconizadas pela integração lavoura-pecuária: a área "A" se encontrava composta de braquiária (*Brachiaria brizantha*) e a área "B" havia sido recém cultivada com milho (*Zea mays* – 2º ano). As amostras de solo foram obtidas nessas duas áreas e ainda em fragmento de mata secundária adjacente. Foi adotado o delineamento experimental, inteiramente casualizado, com 3 repetições em cada tratamento, sendo coletadas 5 sub-amostras de solo em cada uma das repetições.

As amostras de solo (10 cm de diâmetro e 10 cm de profundidade) foram obtidas conforme metodologia descrita por Anderson e Ingram (1993), em conformidade com o programa *Tropical Soil Biology and Fertility* (TSBF) para esse tipo de estudo.

As coletas foram realizadas na estação chuvosa, entre outubro de 2010 e fevereiro de 2011. As amostras coletadas foram acondicionadas em sacos plásticos e, posteriormente, submetidas à separação da meso e macrofauna, no Laboratório de Apoio da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora, MG. As amostras foram vertidas em bandejas brancas, procedendo-se a separação da fauna vista a olho nu (macrofauna). Os organismos isolados foram acondicionados em frascos, previamente identificados, contendo álcool 70% para posterior classificação.

O conteúdo dos frascos foi analisado sob lupa binocular; os organismos foram contados e separados em grandes grupos taxonômicos, acondicionados em frascos menores.

Foi estimado o índice de diversidade de Shannon, a riqueza total e a riqueza média da fauna do solo.

## Resultados e Discussão

Dentre as 45 amostras avaliadas foram isolados 196 indivíduos componentes da meso e macrofauna edáfica (adultos e larvas), posteriormente classificados em 12 grupos taxonômicos, distribuídos em Classe, Ordem ou Família.

Os indivíduos coletados na áreas contendo cultivo de milho, pastagem e fragmento de mata, estão relacionados na Tabela 1.

De acordo com a Tabela 1, o grupo que alcançou maior representatividade foi a Família Formicidae que se destacou no fragmento de mata, alcançando 72,73%. Na pastagem a porcentagem desses animais também foi elevada (52,38%). De acordo com Correia (2002), esses organismos desempenham importante papel na manutenção da qualidade do solo, pois possuem habilidade para sobreviver em solos agrícolas, mesmo sob oscilações climáticas e eventos de perturbação, sendo animais que se adaptam a diversos ambientes com maior facilidade que outros invertebrados.

O segundo grupo mais expressivo foi a Classe Oligochaeta (62,30%), se destacando na área contendo milho em segundo ano de estabelecimento. Os representantes desse grupo são considerados os maiores decompositores secundários, se alimentando de material previamente degradado pelos microrganismos para produzirem os coprólitos que, quando frescos, contém 18 vezes mais amônia e 1,5 vezes mais nitrato do que no solo (ANDRADE, 2000).

A maior proporção de Coleópteros e suas larvas foi encontrada na pastagem estabelecida há dois anos, com valor igual a 9,52% para as fases desse grupo. Esses animais se destacam por apresentarem importante atuação no ambiente como predadores, devido ao alto potencial de regular efetivamente populações pragas, sendo alguns táxons empregados em programas de controle biológico (SUENAGA e HAMAMURA, 2001). As larvas de Coleópteros são importantes por atingirem até 2 metros de profundidade, podendo assim, incorporar material orgânico e nutrientes nas camadas mais profundas do solo.

De acordo com a Tabela 2, o índice de diversidade atingiu 1,72 no fragmento de mata e 1,08 na área "A". A mata é um ambiente mais complexo, possuindo capacidade de fornecer recursos alimentares, refúgios contra predadores e alto índice de matéria orgânica, sendo ainda, capaz de abrigar uma grande diversidade de organismos edáficos. Já a pastagem (área "A") é ótima acumuladora de biomassa no perfil do solo e na parte aérea, por isso, enriquecem o solo com matéria orgânica. Assim, é frequentemente considerada a "fonte de vida do solo", pois fornece energia e nutrientes para a fauna do solo (VILELA et al., 2003).

As riquezas total e média também foram maiores no fragmento de mata, com valores iguais a 6 e 1,73, respectivamente. A área "B" também apresentou valores expressivos desses índices. A maior riqueza de grupos no ecossistema contendo espécies arbóreas pode ter ocorrido, provavelmente, pelo microclima gerado nos compartimentos das coberturas vegetais.

**Tabela 1.** Distribuição relativa (%) dos grupos funcionais da fauna do solo, nas áreas "A", "B" e em fragmento de mata secundária.

	Área "A"	Área "B"	Fragmento de Mata
Acari	-	-	2,73
Chilophoda	4,76	-	0,9
Coleoptera	9,52	3,28	3,64
Diplopoda	4,76	-	-
Diptera	-	-	-
Formicidae	52,38	27,89	72,73
Larva Coleoptera	9,52	3,28	3,64
Larva Diptera	-	1,64	0,9
Homoptera	-	-	1,82
Hemynoptera	-	1,64	-
Oligochaeta	19,04	62,3	12,73
Symphyla	-	-	0,9

**Tabela 2.** Diversidade, Riqueza total (nº de grupos taxonômicos) e Riqueza média (nº médio de grupos taxonômicos) da fauna do solo nas áreas "A", "B" e em fragmento de mata secundária.

	Diversidade de Shannon	Riqueza média	Riqueza total
Área "A"	1,08	0,6	3
Área "B"	0,84	1,07	3,33
Fragmento de Mata	1,72	1,73	6

## Conclusões

Os sistemas de integração lavoura-pecuária podem contribuir para a sustentabilidade do solo, tendo em vista que, a rotação de culturas melhora as propriedades físicas do solo, proporcionando um habitat rico em matéria orgânica que favorece a abundância e a diversidade da fauna do solo.

## Agradecimentos

A CNPq

### **Literatura citada**

ANDRADE, L. B. O uso da fauna edáfica como bio-indicadora de modificações ambientais em áreas degradadas. **Monografia Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, 2000.

MANHÃES, C. M. C. Caracterização da fauna do solo e da serrapilheira de leguminosas florestais em pastagens na região norte fluminense. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 2, 2007.

MÜLLER, M. D.; SANTOS, A. M. B.; PACIULLO, D. S. C.; MARTINS, C. E.; CASTRO, C. R. T. Cuidados para o estabelecimento de árvores em sistemas de integração lavoura-pecuária-floresta. **Circular técnica**, Juiz de Fora – MG, 2010.

SPERA, S. T.; SANTOS, H. P.; FONTANELI, R. S.; TOMM, G. O. Efeito de pastagens de inverno e de verão em características físicas de solo sob plantio direto. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.4, p. 1193-1200, 2006.

SUENAGA, H.; HAMAMURA, T. Occurrence of carabid beetles (Coleoptera: Carabidae) in cabbage fields and their possible impact on lepdopteran pests. **Applied Entomology and Zoology**, v. 36, p. 151-160, 2001).

VILELA, L.; MACEDO, M. C. M.; MARTHA, G. B.; KLUTHCOUSKI, J. Cap. 5 - Benefícios da integração lavoura-pecuária. In: KLUTHCOUSKI, J.; STONE, L. F.; AIDAR, H. Integração Lavoura-Pecuária. Goiás, GO. Embrapa Arroz e Feijão, 2003.

# Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite



## XI Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

### Trabalhos:

#### **1. Tolerância à toxidez por alumínio em genótipos de capim-elefante**

Autores: Pedro Henrique de Queirós Carlos, Rafael Agostinho Ferreira, Ítalo Lopes Goulart, Carlos Eugênio Martins, Juarez Campolina Machado, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto de Souza Sobrinho, Francisco José da Silva Lédo, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Alexandre Magno Brighenti dos Santos

#### **2. Efeito da adubação nitrogenada sobre a produção de leite, peso e escore corporal de vacas mestiças Holandês x Zebu em pastagem de Estrela-africana, sob irrigação**

Autores: Ítalo Lopes Goulart, Rafael Agostinho Ferreira, Pedro Henrique Queirós, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Carlos Eugênio Martins, Fausto Souza Sobrinho, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fermio Deresz

#### **3. Efeito da adubação nitrogenada, sobre a produção de biomassa, altura e cobertura de capim Estrela-Africana, sob irrigação.**

Autores: Rafael Agostinho Ferreira, Ítalo Lopes Goulart, Pedro Henrique Queirós, Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto Souza Sobrinho, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Henrique Louro Advincula

#### **4. Efeito de nanopartículas de prata na cinética de fermentação ruminal in vitro e produção de metano**

Autores: Paula Pereira Ribeiro de Moura; Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

#### **5. Cinética de fermentação ruminal in vitro de ração total com glicerina bruta**

Autores: Maysa Andrade, Fernanda Samarini Machado, Fernanda Samarini Machado, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

#### **6. Mudanças no uso e cobertura das terras na Bacia do Alto Rio Grande-MG: uma análise multi-temporal**

Autores: Franciele de Oliveira Pimentel, Marcos Cicarini Hott, Cássia de Castro Martins Ferreira

#### **7. Taxa de consumo de leite e derivados não pasteurizados por uma população de alta vulnerabilidade social no Brasil em 2010**

Autores: Marcio Roberto Silva, Guilherme Nunes de Souza, Ronaldo Rodrigues Costa, Flávio Ribeiro Araújo, Samuel Miguel Hylario, Bernardo Barbosa Rocha, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

**8. Infecções humanas por *Mycobacterium bovis* no Brasil: avaliação de fatores de risco**

Autores: Marcio Roberto Silva, Guilherme Nunes de Souza, Ronaldo Rodrigues Costa, Flávio Ribeiro Araújo, Samuel Miguel Hylario, Bernardo Barbosa Rocha, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira

**9. Diagnóstico molecular de doenças genéticas em bovinos da raça Gir**

Autores: Lorena Evangelista Fernandes, Karina Braz Bernardo, Daniele Ribeiro de Lima Reis, Rui da Silva Verneque, Marco Antonio Machado

**10. Duplicação cromossômica em híbridos interespecíficos entre capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*).**

Autores: Carolina de Souza Fonseca, Ana Luisa Sousa Azevedo, Juliane Dornellas Nunes, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Ledo, Antônio Vander Pereira

**11. Identificação e Recuperação Automática de SNPs**

Autores: Leonardo Carvalho Nápolis Costa, Leonardo Gravina, Camilo Falcão, Wagner Arbex

**12. Percepção ambiental dos produtores de leite localizados em municípios da Zona da Mata Mineira**

Autores: Cristina Silva de Oliveira, Heloisa Carneiro, Amanda Nascimento de Faria

# **Tolerância à toxidez por alumínio em genótipos de capim-elefante<sup>1</sup>**

## **Genetic diversity for tolerance to aluminum toxicity in elephant grass genotypes**

Pedro Henrique de Queirós Carlos<sup>2</sup>, Rafael Agostinho Ferreira<sup>2</sup>, Ítalo Lopes Goulart<sup>2</sup>, Carlos Eugênio Martins<sup>3</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>3</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>3</sup>, Fausto de Souza Sobrinho<sup>3</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>3</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>3</sup>, Alexandre Magno Brighenti dos Santos<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Etapas preliminares do trabalho financiada pela Unipasto

<sup>2</sup>Estudantes de Biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF – Av. Luz Interior, 345 – 36030-776 – Bairro Estrela Sul – Juiz de Fora/MG

<sup>3</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, D.Sc. – Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 – Juiz de Fora/MG – carlos.eugenio@embrapa.br

**Resumo:** A compreensão da variabilidade e da diversidade genética em relação à toxidez por alumínio é etapa indispensável em programas de melhoramento e de recursos genéticos visando identificar acessos, que em combinações híbridas teriam maior chance de êxito na seleção para condições de estresse. O objetivo do presente trabalho foi estudar a variabilidade genética para tolerância a toxidez por alumínio em capim-elefante e a importância de cada característica sobre a variação total disponível no germoplasma. Foram avaliados 44 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa. Após a brotação das gemas em substrato comercial, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 2 L de solução nutritiva, acrescida de 15 mg/L de alumínio. Constatou-se que existe variabilidade genética entre os acessos de capim-elefante para a tolerância a toxidez por alumínio. As características produção de matéria-seca de raiz e da parte aérea foram as que mais contribuíram para a divergência genética. O acesso Kizosi é promissor como fonte de genes/alelos visando o melhoramento para condições de estresse por alumínio. Os acessos Cameroon, Sem Pelo, Cuba 115, Taiwan A-146, King Grass podem ser cruzados com os acessos Três Rios e Taiwan A-121, com potencial de sucesso, uma vez que são divergentes e apresentam médias elevadas para as principais características de interesse para tolerância a toxidez por alumínio em capim-elefante.

**Palavras-chave:** *Pennisetum* spp., Genética vegetal, Melhoramento de forrageiras, Produção de forragem.

**Abstract:** The comprehension of variability and genetic diversity regarding aluminum toxicity is necessary in breeding programs and genetic resources programs to identify accessions that in hybrid combinations had higher probability of success in selecting for stress conditions. The objective of this work was to study the genetic variability for tolerance to aluminum toxicity in elephant grass and evaluated the importance of each trait on the total variation. In this experiment 44 accessions from the Elephant Grass Active Germplasm Bank of Embrapa were evaluated. After the regrowth of forage in commercial substrate, seedlings were transferred to plastic pots with a capacity of 2 L of nutrient solution in addition of 15 mg/L of aluminum. There is genetic variability among accessions of elephant grass for tolerance to aluminum toxicity. The characteristics roots dry-matter and shoots dry-matter production contributed the most for the genetic diversity. The accession Kizosi is promising as source of genes of interest to improve for aluminum stress. The accessions Cameroon, Sem Pelo, Cuba 115, Taiwan A-146, King Grass could be crossed with the accessions Tres Rios and Taiwan A-121, with potential of success, because they are divergent and show high scores for the most relevant characteristics regarding tolerance to aluminum toxicity in elephant grass.

**Keywords:** *Pennisetum* spp., Plant genetics, Forage breeding, Forage production.

## Introdução

A maioria dos solos brasileiros destinados à produção vegetal apresenta baixa fertilidade e problemas de acidez e toxidez por alumínio. No caso específico das pastagens, que normalmente ocupam áreas marginais, esses problemas são ainda mais sérios (MARTINS et al., 2010). A alta concentração de alumínio nos solos ácidos é, portanto, um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento das plantas (KOCHIAN et al., 2005) e assume papel importante na agricultura e pecuária nacionais, afetando diretamente os processos fisiológicos e metabólicos da grande maioria das espécies cultivadas.

Existe ampla variabilidade no comportamento em condições de estresse causado pelo alumínio. Entre as plantas forrageiras o capim-elefante, é considerado como muito exigente, e de forma geral não se adapta a solos de baixa fertilidade e de elevada saturação por alumínio. Dentre as características negativas apresentadas pode-se citar o amarelecimento das folhas pela interferência na biossíntese da clorofila, arroxamento nas bainhas e margens do limbo e atrofiamento (PEIXOTO et al., 2007).

A compreensão da variabilidade existente e a avaliação da diversidade genética em relação ao alumínio tóxico no germoplasma de capim-elefante auxiliarão os programas de melhoramento e de recursos genéticos na identificação de acessos que, em combinações híbridas teriam maior chance de êxito na seleção para condições de estresse, possibilitando a obtenção de cultivares de capim-elefante tolerantes ao alumínio tóxico.

O objetivo do presente trabalho foi estudar a variabilidade genética e a importância de características sobre a variação total disponível entre os acessos de capim-elefante em relação tolerância a toxidez por alumínio.

## Material e Métodos

Foram avaliados 44 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa (BAGCE). O experimento foi instalado em casa de vegetação no delineamento inteiramente casualizado, com três repetições e parcelas de um vaso com uma planta. De cada um dos acessos foram obtidas mudas, pelo enraizamento de gemas em substrato comercial. Após o período de enraizamento, as plântulas foram selecionadas quanto à uniformidade de tamanho de parte aérea e de raízes, e transplantadas para vasos plásticos, com volume de dois litros de solução nutritiva de Clark, 1975.

Durante os primeiros sete dias as plantas cresceram em solução com metade da concentração de nutrientes recomendada, sem aplicação de alumínio. Depois desta etapa e durante 29 dias, promoveu-se, semanalmente, a troca da solução nutritiva, acrescida de 15 mg/L de alumínio. A cada troca de solução nutritiva o pH da mesma era ajustada para 4,5. Foram avaliadas as características produção de matéria seca de parte aérea (MSPA) e de raiz (MSRAIZ), os incrementos no número de perfilhos (INP), e os incrementos no crescimento da parte aérea (IPA) e das raízes (IRAIZ).

Inicialmente foram realizadas análises univariadas (teste F) em todas as características avaliadas, considerando o efeito de tratamentos como fixo. Constatada diferenças significativas, foi realizado o teste de média de Scott & Knott a 5% de probabilidade. Para as análises de diversidade genética foi utilizada a distância generalizada de *Mahalanobis* como medida de dissimilaridade. O agrupamento foi realizado pelo método de UPGMA e também pelo método de otimização de *Tocher*. Foi estudada a importância relativa de cada característica na predição da divergência genética conforme o método de Singh. Para todas as análises estatísticas utilizaram-se os recursos computacionais do Programa GENES.

## Resultados e Discussão

Foram constatadas diferenças significativas entre os acessos para todas as características mensuradas ( $P < 0,05$ ), indicando a existência de variabilidade genética.

Portanto, existe variação para as características estudadas e é possível ter sucesso em programas de melhoramento com o uso de germoplasma tradicional, sobretudo para condições de estresse (DAWSON et al., 2008).

O acesso Kizozi, também referido como Baiano apresentou melhor resposta para a maioria das características, demonstrando capacidade de adaptação à toxidez por alumínio. Este acesso é uma espécie selvagem *Pennisetum* spp., e poderá ser utilizado como fonte de genes/alelos, visando o melhoramento para condições de estresse. Alguns acessos de *P. purpureum* apresentaram resultados semelhantes ao Kizozi, e também podem ser considerados tolerantes ao alumínio tóxico. São eles: Cameroon, Gigante de Pinda, Sem Pelo, Três Rios, Cuba 115, Taiwan A-146, King Grass, Taiwan A-121.

O agrupamento das cultivares pelo método de *Tocher* foi realizado utilizando-se as distâncias entre os pares de acessos, e possibilitou a reunião em 11 grupos distintos (Tabela 1). Constatou-se que o método em questão foi concordante com o método de agrupamento UPGMA. Apesar da diversidade constatada, de modo geral, interessam aos melhoristas apenas aqueles acessos superiores em relação às características mais importantes e que apresentam divergência suficiente para gerar variabilidade nas populações segregantes, haja vista que a variabilidade genética de uma população depende da divergência genética dos genitores envolvidos no cruzamento para as características de interesse (FALCONER, 1987).

Pelo estudo da importância relativa das características conforme método de Singh constatou-se que a MSRAIZ e MSPA foram as que mais contribuíram para a divergência genética e explicaram 41,2 % da variância total entre os acessos em relação à tolerância ao alumínio tóxico (Tabela 2). Resultado semelhante foi observado por Martins et al. 2010 que identificaram a característica MSPA como indicada para futuras avaliações de tolerância de capim-elefante ao alumínio.

O cruzamento entre acessos de grupos distintos deve, portanto, aliar acessos divergentes e de média elevada para as características de interesse. Dessa forma, o acesso Kizozi deverá ser utilizado visando a incorporação de genes/alelos para condições de estresse. Os acessos Cameroon, Sem Pelo, Cuba 115, Taiwan A-146, King Grass foram agrupados conjuntamente, e podem ser cruzados com os acessos Três Rios e Taiwan A-121, com potencial de sucesso, uma vez que são divergentes e apresentam médias elevadas para as principais características de interesse para tolerância ao alumínio tóxico.

**Tabela 1.** Agrupamento, pelo método de otimização de *Tocher*, de 44 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa. Juiz de Fora, MG, 2011.

Grupo	Acessos
< 1 >	Cuba 115; Cuba 116; Vruckwona Africano; BAGCE 69; King Grass; Guaco; Porto Rico; Elefante de Pinda; IAC-Campinas; Mercker Comum Pinda; Mercker 86 México; Taiwan A-146; Mercker Pinda México; Taiwan A-26; Mole de Volta Grande; Cameroon; Sem Pelo; Roxo
< 2 >	Napier S.E.A; Elefante Cachoeiro do Itapemirim; T241 Piracicaba; BAGCE 50; Tres Rios; Taiwan A-121
< 3 >	Elefante da Colômbia; Capim Cana D'África; BAGCE 2; Porto Rico 534-B
< 4 >	Mercker S.E.A; Mineiro
< 5 >	Taiwan A-25; Roxo Botucatu; Pusa Napier N 1
< 6 >	Costa Rica; IJ 7136
< 7 >	Gigante de Pinda; Kizozi
< 8 >	Taiwan A-148; BAGCE 45; BAGCE 59; Teresópolis
< 9 >	Cubano Pinda
< 10 >	BAGCE 44
< 11 >	Mercker Santa Rita



**Tabela 2.** Contribuição relativa de seis características, avaliadas em 44 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa, com base no método de Singh.

Característica	Variância	Valor em porcentagem
Incrementos no crescimento da parte aérea final	1643,335628	14,8
Incrementos no crescimento da parte aérea inicial	1741,870406	15,6
Incrementos no crescimento de raiz	1351,256054	12,1
Incremento no número de perfilhos	1811,913251	16,3
Produção de matéria seca de parte aérea	1971,197349	17,7
Produção de matéria seca de raiz	2612,000951	23,5

## Conclusões

Existe variabilidade genética entre os acessos de capim-elefante para a tolerância a toxidez por alumínio.

As características produção de matéria-seca de raiz e da parte aérea foram as que mais contribuíram para a divergência genética.

O acesso Kizosi é promissor como fonte de genes/alelos visando o melhoramento para condições de estresse por alumínio.

Os acessos Cameroon, Sem Pelo, Cuba 115, Taiwan A-146, King Grass podem ser cruzados com os acessos Três Rios e Taiwan A-121, visando tolerância à toxidez por alumínio.

## Agradecimentos

- À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da realização deste estágio;
- À Fapemig pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica;
- Aos pesquisadores: Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto de Souza Sobrinho, Flavio Rodrigo Gandolfi Benites, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Léo, Alexandre Magno Brighenti dos Santos pelos ensinamentos;
- Aos assistentes: Raymundo César Verassani de Souza, Reginaldo Neves Santos e Ronaldo de Assis, pelo trabalho de parceria desenvolvido no CEJHB;
- Ao professor Fernando Teixeira Gomes e ao CES/JF pelos ensinamentos;
- Aos bolsistas da Embrapa Gado de Leite, Ítalo, Rafael, Bruno, Henrique, Marcelo, Pedro Henrique e Thaís pelo trabalho desenvolvido na implantação, condução e colheita dos experimentos.

## Literatura Citada

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase in intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.

DAWSON J.C. MURPHY, K.M. JONES, S.S. Decentralized selection and participatory approaches in plant breeding for low-input systems. **Euphytica** 160:143–154, 2008.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**, Trad. SILVA, M.A. & SILVA, J.C. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 1987. 279p.

KOCHIAN, L.V. PINEROS, M.A. HOEKENGA, O.A. The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1, 175-195, 2005.

MARTINS, C.E.; SOUZA SOBRINHO, F.; GOMES, F.T.; ROCHA, W.S.D. BRIGHENTI, A.M. Tolerância à toxidez por alumínio em capim-elefante. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**. n. 3, n. 1, p. 95-101, 2010.

PEIXOTO, P. H. P.; PIMENTA, D. S.; CAMBRAIA, J. Alterações morfológicas e acúmulo de compostos fenólicos em plantas de sorgo sob estresse de alumínio. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n.1, p.17-25, 2007.

# **Efeito da adubação nitrogenada sobre a produção de leite, peso e escore corporal de vacas mestiças Holandês x Zebu em pastagem de Estrela-africana, sob irrigação**

Ítalo Lopes Goulart<sup>1</sup>, Rafael Agostinho Ferreira<sup>1</sup>, Pedro Henrique Queirós<sup>1</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>2</sup>, Carlos Eugênio Martins<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fermino Deresz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas, Centro de Ensino Superior, Juiz de Fora/MG. italogoulart@gmail.com

<sup>2</sup>Pesquisadores – Embrapa Gado de Leite – Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, CEP – 36038-330 – Juiz de Fora/MG

<sup>3</sup>Pesquisador Aposentado da Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** A disponibilidade de nutriente e água no solo, associados ao manejo do sistema solo/água/planta, influenciam na produção de biomassa vegetal e consequentemente na produtividade de leite e na taxa de lotação. O objetivo do experimento foi avaliar o desempenho de vacas Holandês x Zebu, em pastagem de Estrela-africana, adubadas com diferentes doses de nitrogênio, sob irrigação. O experimento foi conduzido no campo Experimental de Santa Mônica (Valença/RJ). Inicialmente utilizou-se uma taxa de lotação fixa de 6UA/ha, que foi aumentada ou diminuída em função do aumento ou da diminuição da biomassa vegetal do capim Estrela-africana, em função dos tratamentos. O controle leiteiro foi realizado semanalmente e a pesagem dos animais e condição corporal a cada 28 dias. Foram avaliadas a produtividade de leite por área e a taxa de lotação. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão (Tukey,  $p < 0,05$ ). A dose máxima de nitrogênio para atingir a máxima produção biológica variou de 430 a 532 kg/ha. No caso da taxa de lotação máxima a dose variou de 412 a 496 kg/ha de nitrogênio.

**Palavras-chave:** Produtividade de leite, taxa de lotação, capim Estrela-africana, pastejo rotativo.

**Abstract:** The nutrient availability and soil water, combined to the management of soil/water/plant system, have influence in the vegetal biomass production consequently in the production of milk and stocking rates. Therefore, the objective was to evaluate the performance of Holandes x Zebu cattle in stargrass cv. Africana pastures, fertilized with different nitrogen doses, under irrigation. The experiment was realized on the Embrapa Dairy Cattle experimental area (Valença/RJ). Initially were used the stocking rate of 6UA/ha, being realized a weekly milk control, animal weighing and corporal condition at every 28 days. Were evaluated the milk productivity, and stocking rate. The results were submitted to the variance and regression analysis (Tukey,  $p < 0,05$ ). The maximum nitrogen dose to reach the maxim biological production varied between 430 to 532 kg/ha. Considering the stocking rate maxim, the nitrogen dose varied between 412 to 496 kg/ha.

**Keywords:** milk productivity, stocking rate, stargrass cv. Estrela-africana, rotational grazing.

## **Introdução**

A produção de leite no Brasil passa por um processo de modernização, onde se procura sustentabilidade, aumento da produtividade e redução nos custos. A baixa produção forrageira é um dos fatores que impedem o aumento da produção leiteira, motivada por deficiências nutricional, hídrica e de manejo. O nitrogênio é um dos principais elementos essenciais a limitar o crescimento e a produção de biomassa vegetal. A utilização da água na época seca do ano, a partir do momento em que fatores

climáticos como luminosidade, temperatura e radiação solar não são limitantes para o desenvolvimento das plantas, bem como em épocas em que ocorrem veranicos, constitui excelente alternativa para aumento e estabilização da produção vegetal (ALENCAR, 2007). Portanto, o objetivo foi avaliar o desempenho de vacas Holandês x Zebu, em pastagem de *Cynodon nlemfuensis* cv. Estrela-africana, adubadas com diferentes doses de nitrogênio, sob irrigação.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campo Experimental Santa Mônica (Valença/RJ), pertencente a Embrapa Gado de Leite. Foram utilizadas vacas Holandês x Zebu recém-paridas, as quais foram selecionadas em função da produção de leite, número de lactações, peso vivo e grupo genético.

Foram utilizadas quatro doses de nitrogênio: 0, 200, 400 e 600 kg/ha/ano (ureia como fonte). Foi utilizado um delineamento de blocos ao acaso, em um esquema de subparcelas divididas no tempo. Quanto à irrigação, foi utilizado um sistema baixa pressão, a lâmina de água foi utilizada de acordo com Alencar (2007) e com as avaliações do solo e do clima do local. Quando 50% da água disponível no solo foram consumidos, houve reposição até a capacidade de campo.

A taxa de lotação inicialmente utilizada foi de seis vacas/ha, mas variável de acordo com a disponibilidade de forragem. O manejo da pastagem foi baseado nas recomendações emanadas da Embrapa Gado de Leite. Cada parcela foi dividida em nove piquetes com um hectare cada. Foi utilizado por três dias com um intervalo de desfolha de 24 dias. Os piquetes foram manejados com uma altura de resíduo 20 a 25 cm.

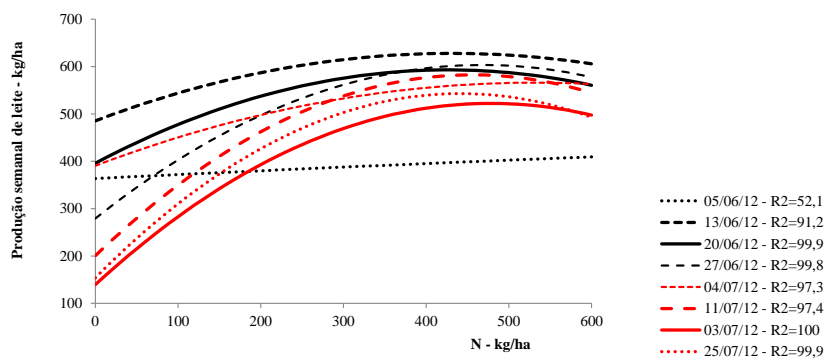
Durante o experimento as vacas receberam suplementação (2 kg/dia de concentrado, com 20% de PB e 70% de NDT), fornecidas nas duas ordenhas diárias. Durante a época seca do ano, além do concentrado, as vacas foram suplementadas com silagem de milho (iniciada na segunda quinzena de julho), na base de 20 kg/vaca/dia, no intervalo das ordenhas da manhã e da tarde. Após a ordenha da tarde as vacas retornavam aos piquetes.

Foram avaliadas a produtividade, a taxa de lotação, o peso e a condição corporal (CC) dos animais a cada 28 dias. O controle leiteiro foi realizado semanalmente. A CC foi avaliada por meio da observação visual (escores: 1 - muito magra, 2 - magra, 3 - regular, 4 - gorda e 5 - muito gorda) (FERREIRA, 1990). Os resultados foram submetidos à análise de regressão e de variância ( $p < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

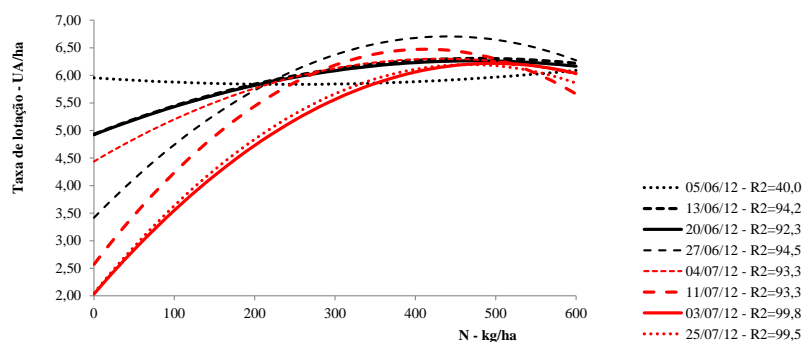
A Produtividade de leite foi influenciada pela adubação nitrogenada (Figura 1). Sendo que a dose máxima de nitrogênio variou de 430 a 532 kg/ha, o que demonstra que não há necessidade de adicionar mais do que 600 kg/ha. É importante salientar que esta dose é para atingir a máxima produção biológica e não a máxima produção econômica. Além do custo alto do nitrogênio a maior quantidade de nitrogênio no solo pode favorecer a contaminação pela lixiviação deste elemento na forma de nitrato.

A taxa de lotação variou muito, principalmente nos tratamentos que receberam menor quantidade de nitrogênio (Figura 2). Como ocorreu com a produtividade de leite, a máxima eficiência foi verificada com quantidade de nitrogênio aplicada menor do que os 600 kg/ha, sendo que variou de 412 a 496 kg/ha, com uma taxa de lotação variando de 2,0 a 6,7 UA/ha. Como era esperado, o aumento na quantidade de nitrogênio adicionada permitiu a manutenção do maior número de animais por hectare, porém, sem superar 7 UA/ha.



**Figura 1.** Produtividade de leite em relação à adubação nitrogenada.

05/06/2012 -  $y = -0,000013x^2 + 0,0838x + 363,71$ . 13/06/2012 -  $y = -0,000768x^2 + 0,6614x + 485,43$ .  
 20/06/2012 -  $y = -0,001081x^2 + 0,9290x + 396,00$ . 27/06/2012 -  $y = -0,001479x^2 + 1,3847x + 279,19$ .  
 04/07/2012 -  $y = -0,000620x^2 + 0,6597x + 390,52$ . 11/07/2012 -  $y = -0,001837x^2 + 1,6755x + 200,46$ .  
 18/07/2012 -  $y = -0,001675x^2 + 1,6015x + 139,47$ . 25/07/2012 -  $y = -0,001995x^2 + 1,7619x + 153,93$



**Figura 2.** Taxa de lotação em relação à adubação nitrogenada.

05/06/2012 -  $y = 0,000002x^2 - 0,00097x + 5,955$ . 13/06/2012 -  $y = -0,000006x^2 + 0,00574x + 4,931$ .  
 20/06/2012 -  $y = -0,000006x^2 + 0,00567x + 4,924$ . 27/06/2012 -  $y = -0,000017x^2 + 0,01496x + 3,416$ .  
 04/07/2012 -  $y = -0,000010x^2 + 0,00864x + 4,437$ . 11/07/2012 -  $y = -0,000023x^2 + 0,01895x + 2,570$ .  
 18/07/2012 -  $y = -0,000017x^2 + 0,01687x + 2,033$ . 25/07/2012 -  $y = -0,000019x^2 + 0,01775x + 2,050$ .

## Conclusões

A dose máxima de nitrogênio para atingir a máxima produção biológica variou de 430 a 532 kg/há. No caso da taxa de lotação máxima a dose variou de 412 a 496 kg/ha.

## Agradecimentos

- À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da realização deste estágio;
- À Fapemig;
- À Embrapa pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica;
- Aos pesquisadores: Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto de Souza Sobrinho, Flavio Rodrigo Gandolfi Benites, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Léo, Alexandre Magno Brighenti dos Santos, pelos ensinamentos;
- Aos assistentes Raymundo César Verassani de Souza, Reginaldo Neves Santos e Ronaldo de Assis, pelo trabalho de parceria desenvolvido no CEJHB;
- Ao professor Fernando Teixeira Gomes e ao Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora pelos ensinamentos.
- Aos bolsistas da Embrapa Gado de Leite, Ítalo, Rafael, Pedro, Marcelo, Henrique, Bruno, Thaís e Pedro Henrique pelo trabalho desenvolvido na implantação, condução e colheita dos experimentos.

### **Literatura Citada**

**ALENCAR, C. A. B. Crescimento e a produção de seis de gramíneas tropicais submetidas a diferentes lâminas de água e adubação nitrogenada, na Legião Leste de Minas Gerais.** Departamento de Engenharia Agrícola – Universidade Federal de Viçosa. 2007. Tese de Doutorado. 151p.

**FERREIRA, A. M. Efeito da amamentação e do nível nutricional na atividade ovariana de vacas mestiças leiteiras.** Viçosa, UFG, 1990. 134p.

# **Efeito da adubação nitrogenada, sobre a produção de biomassa, altura e cobertura de capim Estrela-Africana, sob irrigação.**

## **Soil covering, and *Cynodon nlemfuensis* productivity and height submitted to different nitrogen doses, under irrigation.**

Rafael Agostinho Ferreira<sup>1</sup>, Italo Lopes Goulart<sup>1</sup>, Pedro Henrique Queirós<sup>1</sup>, Carlos Eugênio Martins<sup>2</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Henrique Louro Advincula<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas, Centro de Ensino Superior, Juiz de Fora/MG. agostinhorafael@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisadores – Embrapa Gado de Leite – Rua Eugênio do Nascimento, 610, Bairro Dom Bosco, CEP – 36038-330 – Juiz de Fora/ MG

**Resumo:** A utilização de adubação nitrogenada em pastagens é prática fundamental quando se pretende aumentar a produção de matéria seca. Porém, há poucas informações da resposta de capim Estrela-Africana, em sistema de pastejo rotacionado irrigado, à adubação nitrogenada. O objetivo foi avaliar o efeito da adubação nitrogenada em pastagem de *Cynodon nlemfuensis* (cv. Estrela-africana) sob irrigação, utilizando o sistema fixo de irrigação por aspersão. O experimento foi conduzido no Campo Experimental Santa Mônica (Valença/RJ). Foram utilizadas quatro doses de nitrogênio (ureia como fonte). Foi utilizado um delineamento de blocos ao acaso, em um esquema de subparcelas divididas no tempo. Foram avaliados o crescimento da forrageira, a cobertura do solo e a produtividade de biomassa. Os resultados foram submetidos à análise de variância e de regressão (Tukey,  $p < 0,05$ ). Há efeitos do aumento das doses de nitrogênio na altura das plantas, cobertura do solo e produtividade de forragem de capim Estrela Africana. De forma geral, doses superiores à 400 kg de N/ha não devem ser recomendadas para a cultura.

**Palavras-chave:** nitrogênio, Estrela-Africana, irrigação, pastejo rotacionado.

**Abstract:** The use of nitrogen fertilization in pastures is a fundamental practice when the aim is production increasing of dry matter. However, there are few information about the response of stargrass in a rotational grazing system that uses irrigation. Therefore the objective was to appraise the effects of the nitrogen fertilization in pastures of *Cynodon nlemfuensis* (stargrass cv. Africana) using the fixed sprinkler irrigation system. The experiment was realized on the Embrapa Dairy Cattle (Valença/RJ). Were used four doses of nitrogen fertilization (urea as N source). The experiment was a split plot in a randomized complete block design, with two replications. Were evaluated the growth of the forage, the soil cover and the production of the culture. The results were submitted to the variance and regression analysis (Tukey,  $p < 0,05$ ). There are effects of the increase of the nitrogen doses in the plants height, soil covering and productivity of stargrass forage cv. African. Larger doses than 400 kg/ha should not be recommended for the culture.

**Keywords:** nitrogen, stargrass cv. Africana, irrigation, rotational grazing.

## **Introdução**

A produção de leite e de carne a partir de pastagens é considerada a forma mais eficiente de utilização dos recursos naturais, para reduzir os custos de produção.

HOLMES (1996), em trabalhos de produção animal, afirmou que a produção de leite a pasto era o sistema mais econômico de se produzir.

Em relação aos recursos forrageiros utilizados ainda há demanda por informações do uso das cultivares do gênero *Cynodon* e outras gramíneas tropicais manejadas em sistema de pastejo rotativo.

A utilização de adubação nitrogenada em pastagens é prática fundamental quando se pretende aumentar a produtividade, pois o nitrogênio presente no solo não é suficiente para as gramíneas de alta produção expressar o seu potencial (GUILHERME et al., 1995). Desta forma, o objetivo foi avaliar o efeito das doses de nitrogênio em pastagem de *Cynodon nlemfuensis* (cv. Estrela-africana) sob irrigação.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campo Experimental Santa Mônica (Valença/RJ). Foram utilizadas quatro doses de nitrogênio: 0, 200, 400 e 600 kg/ha/ano.

Foram utilizados juntamente com a adubação nitrogenada, mais 50 kg/ha/ano de  $P_2O_5$  e 200 kg/ha/ano de  $K_2O$ , conforme resultado da análise de solo. O fósforo foi aplicado de uma única vez no início da época chuvosa e o nitrogênio e o potássio, em oito parcelas iguais.

Foi utilizado o sistema de irrigação de baixa pressão. O turno de rega e a lâmina de água foram determinados de acordo com os resultados obtidos por Alencar (2007). Quando 50% da água disponível no solo foram consumidos, houve reposição de água até que o solo atingisse novamente a capacidade de campo. A água disponível no solo foi medida por meio do uso de tubos tensiométricos.

Cada parcela, foi dividida em nove piquetes. Cada piquete foi utilizado por um período de três dias com um intervalo de desfolha de 24 dias. A taxa de lotação foi baseada na disponibilidade de forragem. Inicialmente, utilizou-se uma carga fixa de seis unidades animal/ha (UA/ha), que foi aumentada ou diminuída, em função do aumento ou da redução na disponibilidade de forragem.

Foi utilizado um delineamento de blocos ao acaso, em um esquema de subparcelas divididas no tempo. Foram avaliadas: produção de matéria seca, altura de plantas e cobertura do solo pela vegetal. Os resultados foram submetidos à análise de regressão e de variância ( $p < 0,05$ ).

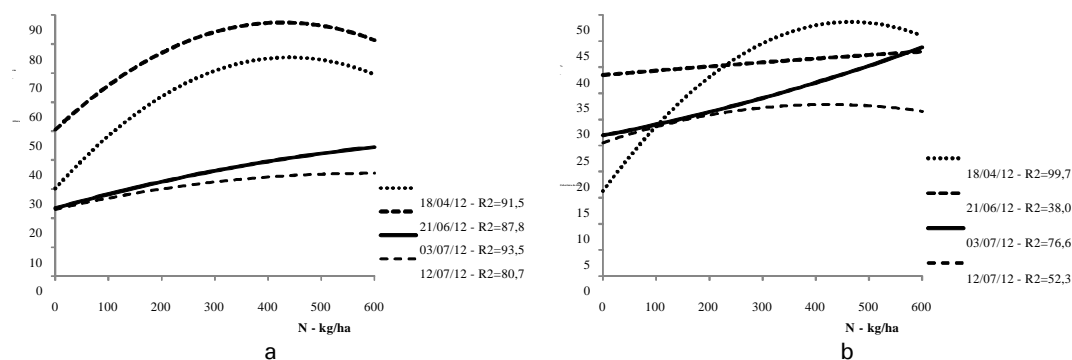
## Resultados e Discussão

A adubação nitrogenada influenciou todas as características (Figuras 1a, 1b, e 2). Para a altura das plantas observou-se relação direta com o incremento das doses de N. Nas duas primeiras avaliações, onde as condições ambientais eram favoráveis ao desenvolvimento da forrageira, com temperatura mais elevada, houve decréscimo da altura das plantas para as doses mais elevadas de N. Esse fato provavelmente ocorreu em função do acamamento das plantas, que cresceram muito e de forma rápida em função da adubação. Doses superiores à 400 kg de N/ha podem causar redução na altura das plantas.

A cobertura do solo mostrou relação linear positiva com as doses de N aplicadas, à exceção da avaliação realizada no dia 18/04/2012, onde houve efeito quadrático. Nesse caso, o ponto de inflexão da curva está próximo aos 400 kg de N/ha, semelhante ao resultado observado para a altura das plantas.

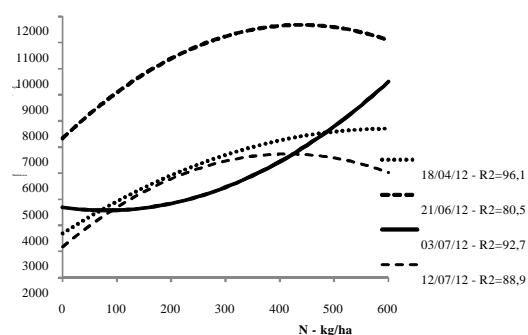
Os efeitos das doses de nitrogênio aplicadas à forrageira foram quadráticos em todas as épocas de avaliação, sendo positivos em três delas e negativos na avaliação realizada no dia 03/07/2012. Neste último caso os acréscimos observados em produtividade de forragem foram pequenos nas menores doses de N e aumentaram com o incremento deste nutriente. Nas demais avaliações, a tendência observada para a altura de plantas e a cobertura de solo foram mantidas, ou seja, resposta positiva à adubações com aproximadamente 300 a 400 kg de N/ha. A partir desta dose observou-se redução nos incrementos na produção de forragem ou mesmo decréscimo desta.





**Figura 1.** Altura (a) e cobertura do solo (b) em relação à adubação nitrogenada.

18/04/2012 -  $y = -0,000233x^2 + 0,20532x + 30,16$ . 21/06/2012 -  $y = -0,000203x^2 + 0,17330x + 50,46$ .  
03/07/2012 -  $y = -0,000026x^2 + 0,05065x + 23,43$ . 12/07/2012 -  $y = -0,000036x^2 + 0,04225x + 23,05$ .  
18/04/2012 -  $y = -0,00015x^2 + 0,1390x + 16,29$ . 21/06/2012 -  $y = -0,000002x^2 + 0,0087x + 38,49$ .  
03/07/2012 -  $y = 0,000014x^2 + 0,0197x + 26,94$ . 12/07/2012 -  $y = -0,000041x^2 + 0,0346x + 25,55$ .



**Figura 2.** Produtividade em relação à adubação nitrogenada

18/04/2012 -  $y = -0,01111x^2 + 13,3499x + 3691,09$ . 21/06/2012 -  $y = -0,02254x^2 + 19,7875x + 7332,81$ .  
03/07/2012 -  $y = 0,01820x^2 - 2,8936x + 4689,49$ . 12/07/2012 -  $y = -0,02063x^2 + 17,1016x + 3187,02$ .

Na Figura 3 é apresentada uma visão geral da área experimental antes do início da fase de avaliação do desempenho animal (Figura 3 a), enquanto a Figura 3 b, apresenta fotografia do processo de avaliação da disponibilidade de forragem, por ocasião da entrada das vacas nos piquetes.



**Figura 3.** Visão geral da área experimental antes do início da fase de avaliação do desempenho animal (a), processo de avaliação da disponibilidade de forragem, por ocasião da entrada das vacas nos piquetes (b).

### **Conclusões**

De forma geral, doses superiores à 400 kg de N/ha não devem ser recomendadas para a cultura.

### **Agradecimentos**

- À Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da realização deste estágio;
- À Fapemig pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica;
- Aos pesquisadores: Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto de Souza Sobrinho, Flavio Rodrigo Gandolfi Benites, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Léo, Alexandre Magno Brighenti dos Santos, pelos ensinamentos;
- Aos assistentes Raymundo César Verassani de Souza, Reginaldo Neves Santos e Ronaldo de Assis, pelo trabalho de parceria desenvolvido no CEJHB;
- Ao Professor Fernando Teixeira Gomes e ao Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora-CES/JF pelos ensinamentos
- Aos bolsistas da Embrapa Gado de Leite, Ítalo, Rafael, Pedro, Pedro Henrique, Henrique, Bruno e Marcelo pelo trabalho desenvolvido na implantação, condução e colheita dos experimentos.

### **Literatura citada**

ALENCAR, C. A. B. **Crescimento e a produção de seis de gramíneas tropicais submetidas a diferentes lâminas de água e adubação nitrogenada, na Região Leste de Minas Gerais.** Departamento de Engenharia Agrícola – Universidade Federal de Viçosa. 2007. Tese de Doutorado. 151p.

GUILHERME, L.R.G.; VALE, F.R.; GUEDES, G.A.A. **Fertilidade do solo:** dinâmica e disponibilidade de nutrientes. Lavras: Escola Superior de Agricultura de Lavras, 1995. 171p.

HOLMES, C.W. Produção de leite a baixo custo em pastagens: uma análise do sistema neozelandês. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GADO LEITEIRO, 2., 1995, Piracicaba. **Anais...** Piracicaba: FEALQ, 1996. p.69-95.

# **Efeito de nanopartículas de prata na cinética de fermentação ruminal *in vitro* e produção de metano**

## **Effects of nanoparticles of silver on fermentation kinetics and methane production**

Paula Pereira Ribeiro de Moura<sup>1</sup>; Fernanda Samarini Machado<sup>2, 3</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>2</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estagiária, bolsista PIBIC Fapemig

<sup>2</sup>Pesquisadores Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup>Contato: fernanda.machado@embrapa.br

**Resumo:** O experimento foi realizado no laboratório da Embrapa Gado de Leite com o objetivo de testar os efeitos da inclusão de nanopartículas de prata em diferentes concentrações sobre a cinética de fermentação ruminal *in vitro* e produção de metano. Foi utilizada a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases ajustadas a um modelo bicompartimental. Os dados de produção de metano foram submetidos à análise de variância e as médias estudadas por meio de regressão (1974) e do teste F ( $p < 0,05$ ), para as variáveis adição de nanopartícula e tempo, respectivamente. Nota-se redução no volume de produção de gases de carboidratos não fibrosos. Observa-se também aumento no tempo de colonização. A inclusão de nanopartículas de prata não gerou alterações significativas na produção de metano.

**Palavras-chave:** nanopartículas de prata, produção de gás, taxa de degradação.

**Abstract:** The experiment was conducted in the laboratory of Embrapa Dairy Cattle to evaluate the effects of nanoparticles of silver inclusion in different concentrations on ruminal fermentation kinetics *in vitro*. Technique was used *in vitro* semi-automatic gas production set to a bicompartiment model. Data on production of methane were subjected to analysis of variance and means were analyzed by regression (1974) and F test ( $p < 0.05$ ) for adding nanoparticle variables and time, respectively. There was a reduction in the volume of gas production of soluble carbohydrate. It would also increase the colonization time. The inclusion of silver nanoparticles not affects significant changes in methane production.

**Keywords:** silver nanoparticles, gas production, degradation rate.

## **Introdução**

Nanociência e nanotecnologia são as ciências que manipulam a matéria na escala entre 0,1 e 100nm, utilizando-se de princípios da física, química e da biotecnologia, com o intuito de sintetizar novos materiais que possuam novas propriedades, modificar e manipular superfícies, e elaborar microestruturas em duas ou mesmo três dimensões, visando uma determinada aplicação (DAY, 1996).

O uso de nanopartícula de prata como agente antimicrobiano é relativamente novo, e na sua síntese deve-se dar ênfase no controle do tamanho das partículas, pois o efeito bactericida é influenciado pelas dimensões da partícula, tendo as menores partículas os melhores efeitos (DAY, 1996). O mecanismo de ação antimicrobiana proposto para as nanopartículas de prata refere-se à interação com grupos que contêm os elementos enxofre e fósforo que são encontrados tanto nas membranas celulares como no citoplasma das bactérias. Sua interação ocorre com a membrana celular causando danos no processo de respiração celular e, no interior das mesmas, interagem com o DNA impedindo a divisão celular (MORONES et al., 2005).

A fermentação entérica é a principal fonte antropogênica de emissão de metano, responsável por 28% da emissão de metano global. O metano entérico além de estar diretamente relacionado com a eficiência da fermentação ruminal, também gera consequentemente perda de energia nos sistemas de produção. A busca pela redução desses

compostos tem concentrado os esforços de pesquisadores, uma vez que, propiciaria além do aumento da eficiência de conversão dos nutrientes consumidos em produtos consumíveis (carne e leite), redução no impacto dos sistemas de produção no ambiente. A manipulação ruminal através de substâncias introduzidas na ração, ou naturalmente presentes nos alimentos tem oferecido alternativas para aumentar a eficiência de utilização das dietas consumidas pelos ruminantes (LONGO, 2007).

Assim, o presente trabalho objetivou-se avaliar o efeito de seis concentrações de nanopartícula de prata na cinética de fermentação ruminal *in vitro* e produção de metano.

## Material e Métodos

Para a realização do experimento foi utilizada amostra de *Brachiaria brizantha* como controle. A composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* foi de 12,56% de proteína bruta, 60,26% fibra insolúvel em detergente neutro corrigida para cinzas e proteína, 1,59% de extrato etéreo e 11,58% cinzas. Para cada incubação *in vitro*, 0,5 g de MS de amostra moída (1 mm) foi pesado em um saco, sendo utilizadas três repetições por tratamento. Nos frascos foram previamente adicionados os sacos contendo a amostra moída e 24,0 mL de meio de cultura tamponado (THEODOROU et al., 1994), sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Foi avaliado o efeito de seis concentrações (0,005; 0,010; 0,020; 0,040; 0,160; 0,320 mg/mL) de nanopartículas de prata, sendo adicionado 1,0 mL de solução de nanopartícula de prata por amostra aos frascos de fermentação. Aos frascos foram adicionados 12,0 mL do inóculo (líquido ruminal). Posteriormente, os frascos foram vedados com rolha de butil sobre atmosfera de CO<sub>2</sub>, lacrados com anilhas de alumínio e deixados em sala climatizada a 39 °C sob mesa agitadora orbital.

O experimento foi conduzido segundo um delineamento inteiramente casualizado em esquema de parcela subdividida, com três repetições, sendo a adição de nanopartículas alocada na parcela inteira, e os tempos de incubação nas subparcelas.

Para a avaliação da cinética de fermentação ruminal e produção de metano foi utilizada a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases, segundo Maurício et al. (1999). A produção de gases foi mensurada nos tempos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72, 96 horas após a incubação. A leitura do volume de gases foi realizada por meio de aparato de vaso comunicante. No tempo de 6 e 12 horas foram coletadas amostras de gases em exetainers para a determinação da concentração de metano por meio de cromatografia gasosa.

Os dados da cinética da produção cumulativa de gases foram ajustados empregando-se o modelo logístico bicompartimental descrito por Schofield et al. (1994).

Os dados de produção de metano foram submetidos à análise de variância e as médias estudadas por meio de regressão (1974) e do teste F ( $p < 0,05$ ), para as variáveis adição de nanopartícula e tempo, respectivamente.

## Resultados e Discussão

Os parâmetros da cinética de fermentação ruminal encontram-se na Tabela 1. A inclusão de nanopartículas de prata não alterou as taxas de degradação dos carboidratos não fibrosos (k1) e dos carboidratos fibrosos (k2). Em relação ao volume de produção de gases oriundos de carboidratos não fibrosos (v1), houve diminuição em todas as concentrações de nanopartículas de prata, sendo que tal diminuição não seguiu um padrão lógico de acordo com o aumento da concentração. Já o volume de produção de gases oriundos de carboidratos fibrosos (v2) teve um retardo em função do tempo de colonização. Observa-se também aumento no tempo de colonização.

**Tabela 1.** Volume de produção de gases e taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos (v1 e k1), volume de produção de gases e taxa de degradação dos carboidratos fibrosos (v2 e k2) e tempo de colonização (L) da *Brachiaria brizantha* suplementada com concentrações crescentes de nanopartículas de prata (NP).

Tratamentos	v1	v2	k1	k2	L
Padrão	73,58	83,77	0,05	0,01	1h22min
NP 0,005 mg/mL	70,24	82,71	0,04	0,01	1h32min
NP 0,010 mg/mL	60,51	77,59	0,05	0,01	2h41min
NP 0,020 mg/mL	66,13	74,77	0,04	0,01	2h19min
NP 0,040 mg/mL	66,58	84,91	0,05	0,01	2h06min
NP 0,160 mg/mL	67,08	85,69	0,05	0,02	2h23min
NP 0,320 mg/mL	69,30	83,96	0,05	0,01	2h23min

Não houve diferença na produção de metano entre os tratamentos de nanopartículas de prata em relação à produção de metano. E, no que diz respeito aos tempos avaliados, houve aumento da produção de metano à medida que o tempo de fermentação prosseguiu, com 6h a produção de metano foi em média 1,76 mL/g de MS e as 12h 4,69 mL/g de MS.

### Conclusões

A inclusão de nanopartículas de prata influenciou negativamente volume de produção de gases oriundos de carboidratos não fibrosos e não alterou a produção de metano.

### Agradecimentos

A Fapemig

### Literatura Citada

DAY, P. Room at the bottom. **Chemistry in Britain**, v. 32, n. 7, p. 29, 1996.

LONGO, C. **Avaliação *in vitro* de leguminosas taniníferas tropicais para mitigação de metano entérico**. Tese (Doutorado em Ciências) – Piracicaba: Universidade de São Paulo, 2007. 154 f.

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321-330, 1999.

MORONES, J. R.; ELECHIGUERRA, J. L.; CAMACHO, A.; HOLT, K.; KOURI, J. B.; RAMÍREZ, J. T.; YACAMAN, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 16, p. 2346-2353, 2005.

SCHOFIELD, P., PITT, R.E., PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of Animal Science**, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.

THEODOROU, M.K.; WILLIAMS, B.A.; DHANOA, M.S. et al. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feed. **Animal Feed Science and Technology**, v. 48, n. 1, p. 185-197, 1994.

# Cinética de fermentação ruminal *in vitro* de ração total com glicerina bruta

## Ruminal fermentation kinetics in the total ration with crude glycerin

Maysa Andrade<sup>1</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>2, 3</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>2</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Estagiária, bolsista PIBIC Fapemig

<sup>2</sup>Pesquisadores Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup>Contato: mariana.campos@embrapa.br

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da adição de glicerina bruta (GB, 0%, 5%, 10% e 15%, base matéria seca) na fermentação ruminal *in vitro* de rações de vacas leiteiras. Foram avaliados os efeitos sobre a digestibilidade da matéria seca e a cinética de fermentação ruminal. Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado com quatro repetições. Foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gases, sendo utilizado um modelo estatístico bicompartimental, seguido por análise de variância e as médias foram estudadas por meio de análise de regressão, utilizando-se o teste t ( $\alpha = 0,05$ ). Foi observado aumento no volume da produção de gases e na taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos. Não houve efeito no volume da produção de gases oriundo dos carboidratos fibrosos. Houve aumento da taxa de degradação dos carboidratos fibrosos nos níveis intermediários de inclusão de GB. Não houve diferença no tempo de colonização (*lag time*) entre os tratamentos. A glicerina bruta melhorou os parâmetros de fermentação ruminal *in vitro*, quando incluída no concentrado de vacas leiteiras.

**Palavras-chave:** biodiesel, coproduto, digestibilidade, produção de gases.

**Abstract:** The objective of this study was to analyze the results of addition of crude glycerin (CG) in the ruminants total mixed ration in different concentrations (0%, 5%, 10% and 15%, dry matter basis). The effects were evaluated on dry matter digestibility and rumen fermentation kinetics, according to randomized experimental design with four periods. It was used *in vitro* gas production technique adjusted to a bicompartimental statistical model, followed by variance analysis with the means analyzed by regression analysis, using the t test ( $\alpha = 0.05$ ). It was observed an increase in the volume of gas production and degradation rate of non-fiber carbohydrates, while no effect on the volume of gas production of the fiber. The rate of degradation of the fiber increased at intermediate levels of GB inclusion. There was no difference in the lag time between treatments. The crude glycerin is presented as an alternative of energy ingredient in the diet for ruminants by improving ruminal fermentation parameters.

**Keywords:** biodiesel, coproduct, digestibility, gas production.

## Introdução

O recente crescimento da participação de biodiesel na matriz energética mundial contribuiu para o interesse e estudo do processamento de oleaginosas no Brasil pelo fato da possível utilização de coprodutos resultantes do processo de extração do óleo das sementes e transformação deste em biodiesel. A glicerina, composto tricarbólico de alto conteúdo energético, representa um desses coprodutos, a qual pode ser utilizada como suplemento energético na ração animal. Ao mesmo tempo, sua utilização na alimentação de ruminantes reduz o impacto ambiental por diminuir o acúmulo de resíduos no meio ambiente, frente à produção de biodiesel em larga escala vivenciada nos dias atuais, como fonte renovável de energia.

Dietas completas (*Total Mixed Ration* - TMR) podem garantir maior eficiência de produção, em comparação ao oferecimento dos alimentos de forma separada, fato que contribui para um processo de fermentação ruminal mais uniforme, tendo como

consequência melhor aproveitamento dos nutrientes. A glicerina apresenta-se como fonte competitiva de suplemento energético em relação aos grãos para animais. O objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência da inclusão de glicerina bruta na produção de gases, utilizando como base a TMR.

## Material e Métodos

O ensaio *in vitro* de produção de gases foi conduzido na Embrapa Gado de Leite, localizada em Juiz de Fora, Minas Gerais. As amostras utilizadas foram oriundas de dieta total (*Total Mixed Ration* - TMR) formulada para vacas em lactação com produção média de 25,0  $\pm$  4,6 kg/dia de leite, e peso corporal de 494,7  $\pm$  34,7 kg no início do experimento.

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente ao acaso com quatro períodos. Os tratamentos avaliados foram: TMR com 0% de GB (15,65% de proteína bruta - PB, 60,83% de fibra em detergente neutro - FDN e 65,72% de nutrientes digestíveis totais - NDT); TMR com 5% de GB (15,60% PB, 54,59% FDN e 67,26% NDT); TMR com 10% de GB (15,87% PB, 51,26% FDN e 70,44% NDT) e TMR com 15% de GB (16,84% PB, 49,26% FDN e 73,17% NDT).

A glicerina bruta utilizada foi da marca ADM® (*Archer Daniels Midland Company Ltda.*, Rondonópolis, MT), sendo adicionada ao milho picado (planta inteira) por meio de misturador nos níveis de 0, 5, 10 e 15% (base da matéria seca) antes da ensilagem.

Para a avaliação da cinética de fermentação foi utilizada a técnica *in vitro* de produção de gases, segundo Maurício et al. (1999). O inóculo utilizado foi obtido manualmente de três vacas F1 Holandesa x Gir, não lactantes, providas de cânula ruminal. O líquido ruminal foi transportado para o laboratório em garrafa térmica pré-aquecida com água a 39 °C. No laboratório, os inóculos foram filtrados em dupla camada de gaze sob fluxo de CO<sub>2</sub>. Nos frascos contendo amostra e meio de cultura foram adicionados 3,2 mL do inóculo (líquido ruminal). Posteriormente, os frascos foram vedados com rolha de butil sobre atmosfera de CO<sub>2</sub>, lacrados com anilhas de alumínio e deixados em sala climatizada a 39 °C sob mesa agitadora orbital. A produção de gases foi mensurada nos tempos 2, 4, 6, 9, 12, 18, 24, 30, 36, 48, 72, 96 horas após a incubação. A leitura do volume de gases foi realizada por meio de aparato de vaso comunicante, de acordo com Fedorah & Hrudehy, 1983.

Os dados da cinética da produção cumulativa de gases foram ajustados empregando-se o modelo logístico bicompartimental de Schofield et al. (1994). Posteriormente, as estimativas dos parâmetros do modelo foram submetidas à análise de variância, utilizando-se o teste t ( $\alpha = 0,05$ ), e as médias foram também estudadas por meio de análise de regressão.

## Resultados e Discussão

Na Tabela 1 são apresentados os parâmetros de fermentação da TMR com níveis crescentes de inclusão de GB. Observou-se aumento linear ( $P < 0,05$ ) no volume da produção de gases (VfCNF) com a inclusão de GB na TMR, e houve efeito quadrático ( $P < 0,05$ ) na taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos (K1CNF). O aumento pode estar relacionado ao fato da GB testada apresentar rápida disponibilidade para a fermentação. Não houve efeito ( $P > 0,05$ ) da inclusão de GB na TMR no volume da produção de gases dos carboidratos fibrosos (VfCF). Nos níveis intermediários de inclusão de GB houve aumento da taxa de fermentação dos carboidratos fibrosos (K<sub>2</sub>CF). Não houve efeito da inclusão de GB na TMR sobre o tempo de colonização (*lag time*).

**Tabela 1.** Produção cumulativa de gases e parâmetros de produção de gases estimados da *TMR* em função do aumento de inclusão de glicerina bruta na *TMR*.

Variáveis	Inclusão de Glicerina (%)				Regressão	R <sup>2</sup>	CV
	0	5	10	15			
Vf CNF	111,38	116,48	124,95	135,50	$\hat{y} = 1,617x + 109,9475$	97,75%	4,33
K <sub>1</sub>	149,33	159,18	152,83	151,03			3,33
Vf CF	0,0658	0,0742	0,0801	0,0822	$\hat{y} = -0,000063x^2 + 0,002045x + 0,065724$	99,97%	2,97
K <sub>2</sub>	0,0184	0,0196	0,0198	0,0193	$\hat{y} = -0,000018x^2 + 0,000320x + 0,018398$	99,14%	3,26
I	3,20	2,70	2,96	3,14			7,95

Volume de produção de gases dos carboidratos não fibrosos (VfCNF); Taxa de degradação dos carboidratos não fibrosos (K<sub>1</sub>CNF); Volume de produção de gases dos carboidratos fibrosos (VfCF); Taxa de degradação dos carboidratos fibrosos (K<sub>2</sub>CF); Tempo de colonização (L); Coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>).

## Conclusões

Os parâmetros de cinética de fermentação ruminal *in vitro* da *TMR* foram influenciados pela adição crescente de glicerina bruta.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura Citada

FEDORAH, P.M.; HRUDEY, S.E. A simple apparatus for measuring gas production by methanogenic cultures in serum bottles. **Environmental Technology. Letters**, v. 4, p. 425-432, 1983.

MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v. 79, p. 321-330, 1999.

SCHOFIELD, P.; PITT, R.E.; PELL, A.N. Kinetics of fiber digestion from in vitro gas production. **Journal of Animal Science.**, v. 72, n. 11, p. 2980-2991, 1994.



# Mudanças no uso e cobertura das terras na Bacia do Alto Rio Grande-MG: uma análise multi-temporal<sup>1</sup>

## Land use/cover changes in the Alto Rio Grande watershed: A multi-temporal analysis

Franciele de Oliveira Pimentel<sup>2</sup>, Marcos Cicarini Hott<sup>3</sup>, Cássia de Castro Martins Ferreira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte do trabalho de conclusão de curso da primeira autora, como atendimento ao curso de Geografia – UFJF.

<sup>2</sup>Estudante do curso de Geografia – UFJF/Juiz de Fora – estagiária/Embrapa Gado de Leite. e-mail: tiele\_pimentel@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Pesquisador – Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora. e-mail: marcos.hott@embrapa.br

<sup>4</sup>Professora do Departamento de Geociências – UFJF/Juiz de Fora. e-mail: cassia.castro@ufjf.edu.br

**Resumo:** O presente estudo foi realizado na Bacia Hidrográfica do Alto Rio Grande, localizada no sul do Estado de Minas Gerais, tendo com objetivo analisar as alterações no uso e cobertura das terras nos últimos anos, através de um estudo multi-temporal, utilizando imagens do satélite *TM/Landsat 5*. A região da Bacia Alto Rio Grande é uma área de extrema influência antrópica, que vem sofrendo ao longo do tempo uma alteração nos tipos de cultivos e atividades agropecuárias, base da economia da região. Utilizando o método de classificação não-supervisionada, ferramenta existente no software ArcGIS, foi possível a elaboração de uma base de dados cartográficos através do processamento digital das imagens. De acordo com os resultados obtidos na pesquisa, pode-se afirmar que houve um aumento considerável na prática de sivilcultura, havendo uma substituição de lavouras anuais e perenes, bem como de pecuária pelo plantio de eucalipto ou *pinus*.

**Palavras-chave:** bacia hidrográfica, mapeamento, sensoriamento remoto

**Abstract:** This study was carried out about the Alto Rio Grande Watershed, located in the southern of Minas Gerais State, aiming to analyze land use/cover changes in recent years, through a multi-temporal study using satellite images *TM/Landsat 5*. The study area is characterized by extreme anthropogenic influence, which has undergone over time a change in the types of crops and agricultural activities, base of the region's economy. Using the method of unsupervised classification through tools in ArcGIS, it was possible to draw up a cartographic database by digital images processing. From the results obtained in the research, it can be stated that there was a considerable increase in the forestry practices, replacing annual and perennial crops, and livestock by eucalyptus or *pinus* plantations.

**Keywords:** mapping, remote sensing, watershed.

## Introdução

As atividades antrópicas, tais como formação de pastagens, e o crescimento de áreas urbanas e agrícolas têm contribuído de forma significativa para alterar a cobertura vegetal natural da Bacia do Alto Rio Grande. Diante disso, o monitoramento da paisagem de uma região é de extrema importância no planejamento de utilização racional do solo, tendo em vista a velocidade da ocupação do espaço físico. Para Alvarenga et al. (2003), as geotecnologias representadas pelo Geoprocessamento e Sistema de Informações Geográficas (SIG) vêm se mostrando imprescindíveis no contexto do monitoramento ambiental. O Sensoriamento Remoto é cada vez mais utilizadas pela Geografia Física nas análises da superfície terrestre. A interpretação de imagens de satélite auxilia no estudo e no monitoramento de objetos e fenômenos na superfície da Terra. (FLORENZANO, 2011).

A partir das mesmas, são obtidos mapas temáticos como, por exemplo, mapas de uso e cobertura vegetal, que fornecem informações do espaço territorial, indicando as regiões de grande potencial em equilíbrio ou desequilíbrio ambiental, direcionando dessa

forma ações de fiscalização, controle, monitoramento e pesquisa. Silva (2001) afirma que são os estudos espaciais e temporais permitem estudar os ambientes em constante evolução, num cenário prospectivo ou retrospectivo.

## Material e Métodos

A Bacia Hidrográfica do Alto Rio Grande está situada no sul de Minas Gerais e se estende por 33 municípios, abrangendo uma área aproximada de 9.000 km<sup>2</sup> (Figura 1). A área de drenagem é de 240 km de extensão, com uma população de aproximadamente 365.000 habitantes. Os procedimentos metodológicos para elaboração dos mapas temáticos de uso e cobertura da terra teve por princípio a aquisição de imagens de satélite *Landsat-5* disponíveis gratuitamente no banco de dados do INPE, correspondendo a órbita/ponto 218/75, dos anos de 1986, 1992, 2006 e 2011. As imagens de 1986 e 2006 foram utilizadas a fim de que se pudesse interpretar a dinâmica da ocupação das áreas de silvicultura, já que normalmente o manejo de seu corte ocorre aproximadamente de 6 em 6 anos, sendo assim possível a identificação dessas áreas de reflorestamento, por meio de expressão lógica no SIG.



Figura 1. Localização da Área de Estudo.

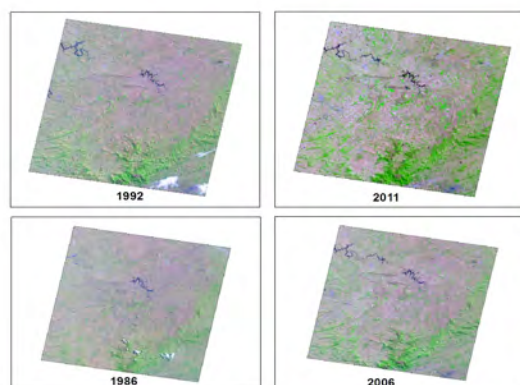


Figura 2. Cenas brutas do *Landsat 5* dos anos de 1986,1992,2006 e 2011.

Foram utilizadas as combinações com as bandas 5, 4 e 3, cuja visualização se ajusta aos canais R (*Red*), G (*Green*) e B (*Blue*) do SIG, para a boa percepção da vegetação e posterior imagem-interpretação, com devida edição e reclassificação para a produção do mapeamento. Para a identificação expedita das classes de uso da terra, utilizou-se a classificação não-supervisionada, através do *software* ArcGis, sendo classificados em

grandes grupos de uso, a seguir: área urbana; água, floresta, agricultura, sombra e silvicultura.

## Resultados e Discussão

Através da classificação não-supervisionada foram produzido os seguintes mapas de uso e cobertura das terras da Bacia do Alto Rio Grande, podendo desse modo fazer uma comparação visual entre as classes de uso e cobertura (Figura 2). Foi feito também a tabulação das classes de usos para os anos de 1992 e 2011, as quais foram geradas a partir da tabela de atributos das classificações, a fim de comparar as áreas ocupadas por categoria (Tabelas 1 e 2).

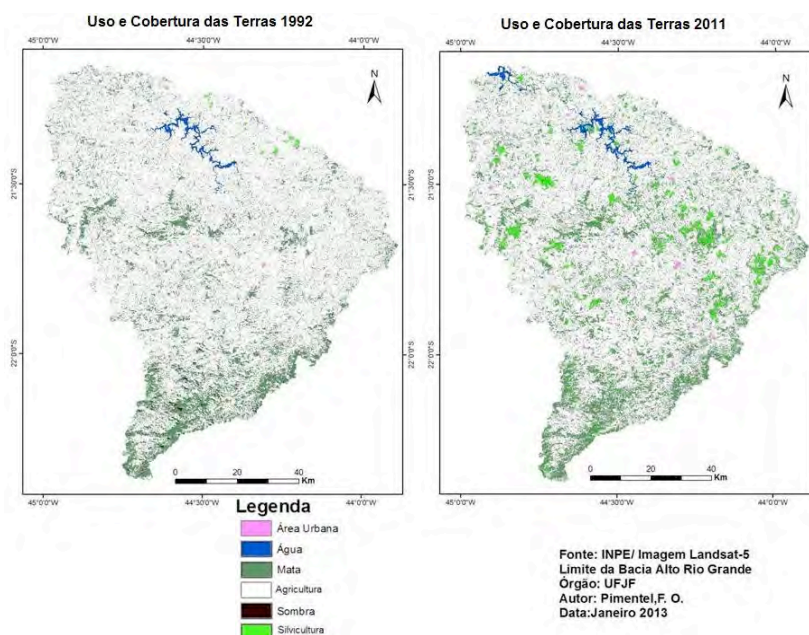


Figura 3. Mapas de uso e cobertura das terras da Bacia do Alto Rio Grande entre 1992 e 2011.

Tabela 1. Área ocupada por cada classe na bacia para o ano de 1992.

Classe de Uso (1992)	Área (km <sup>2</sup> )	Área (ha)	Área (%)
Área Urbana	11,54	1.154,07	0,13
Água	64,9	6.490,71	0,74
Floresta	1.710,30	171.030	19,49
Agricultura	6.939,84	693.984	79,08
Sombra	36,98	3.698,28	0,42
Sivilcultura	11,79	1.179,09	0,13
<b>Total</b>	<b>8.775,35</b>	<b>877.536</b>	<b>100</b>

Tabela 2. Área ocupada por cada classe na bacia para o ano de 2011.

Classe de Uso (2011)	Área (km <sup>2</sup> )	Área (ha)	Área (%)
Área Urbana	26	2.600,64	0,3
Água	94,26	9.426,87	1,07
Floresta	2.085,44	208.544	23,76
Agricultura	6.271,81	627.181	71,47
Sombra	1,9	190,08	0,02
Sivilcultura	295,94	29.594	3,37
<b>Total</b>	<b>8.775,35</b>	<b>877.536</b>	<b>100</b>

De acordo com os resultados podemos afirmar que a área da bacia, continua sendo coberta em sua maioria pela classe Agricultura, que abrange também as áreas de pastagens e forrageiras. As áreas florestadas, correspondentes a classe floresta se concentram mais densamente ao sul da bacia, região que preserva remanescentes da Mata Atlântica, onde estão situadas também as maiores altitudes, nota-se que a vegetação foi mantida, visivelmente não teve nenhuma alteração nesses 19 anos. A classe correspondente a silvicultura, caracterizada pelo plantio do eucalipto ou *pinus*, apresentou um significativo aumento nesses 19 anos, no sentindo centro-norte da bacia, saltando de aproximadamente 1.180 ha para 29.600 ha.

## **Conclusões**

Diante dos resultados, o uso de dados de sensoriamento remoto e as técnicas de Geoprocessamento, vêm se mostrando cada vez mais eficientes para monitorar mudanças em bacias hidrográficas, principalmente quando se trata de detecção de mudanças de áreas em grande escala, pois permite ter uma visão global da área em questão, facilitando a localização das áreas onde se teve a maior concentração de mudanças. O método de classificação não-supervisionada se mostrou bastante preciso, realizando de maneira satisfatória a classificação das terras da bacia, sendo possível a obtenção dados numéricos confiáveis a partir do processamento digital de imagens, e assim diagnosticar a situação atual da cobertura vegetal na Bacia Alto Rio Grande. A atividade de silvicultura, notadamente com a implantação do eucalipto, se intensificou nos últimos anos na região de interesse deste estudo, destacando uma futura alteração na configuração do uso das terras na bacia.

## **Agradecimentos**

A Fapemig

## **Literatura Citada**

ALVARENGA, B. S.; D`arco, E.; Adami, M.; Formaggio, A. R. O ensino de conceitos e práticas de espectroradiometria laboratorial: estudo de caso com solos do estado de São Paulo. In: Anais XI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto 2003, Belo Horizonte. **Anais...** São José dos Campos: INPE, 2003. p.739-747.

FLORENZANO, T. G. **Iniciação em Sensoriamento Remoto**. 2 ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2011.

INPE. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais. Disponível em: <www.inpe.br>. Acesso em: 20 de setembro de 2012.

SILVA, J. X. **Geoprocessamento para a análise Ambiental**. 1. Ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 2001.227 p.

# **Taxa de consumo de leite e derivados não pasteurizados por uma população de alta vulnerabilidade social no Brasil em 2010**

## **Unpasteurized milk and dairy products consumption by a population of high social vulnerability in Brazil in 2010**

Marcio Roberto Silva<sup>1</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>1</sup>, Ronaldo Rodrigues Costa<sup>2</sup>, Flávio Ribeiro Araújo<sup>3</sup>, Samuel Miguel Hylario<sup>4</sup>, Bernardo Barbosa Rocha<sup>5</sup>, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite,

<sup>2</sup>Bioquímico Hospital Regional João Penido. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais,

<sup>3</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Corte,

<sup>4</sup>Bolsista Fapemig,

<sup>5</sup>Mestrando em Veterinária, Universidade Federal de Viçosa,

<sup>6</sup>Professora da Universidade Federal de Viçosa.

**Resumo:** A tuberculose é uma zoonose que pode causar danos irreversíveis à saúde humana. Geralmente os humanos são contaminados por meio do consumo de leite e derivados não pasteurizados. Outra via de contaminação é o contato direto com animais contaminados, sendo esta bem menos frequente. O objetivo desse estudo foi levantar a prevalência do consumo de leite e derivados não pasteurizado por uma população de alta vulnerabilidade social em Juiz de Fora, MG. Entre os 189 entrevistados, 131 (69,3%) nunca viveram na zona rural, 65 (34,4%) tinham história de trabalhar com gado ou agroindústria de alimentos de origem animal, por último 59 (31,2%) e 51 (27,0%) eram consumidores de queijos não pasteurizados no presente e no passado, respectivamente.

**Palavras-chave:** *Mycobacterium bovis*, leite, zoonoses.

**Abstract:** Tuberculosis is a zoonotic disease that can cause irreversible damage to human health. Generally humans are contaminated by raw milk, cheese and dairy products processed from raw milk. Another route of infection is direct contact with infected animals, which is far less frequent. The aim of this study was to survey the prevalence of consumption of unpasteurized milk and dairy products by a population of high social vulnerability in Juiz de Fora, MG. Among the 189 respondents, 131 (69.3%) never lived in a rural area, 65 (34.4%) had a history of working with livestock or agroindustry of foods of animal origin, finally 59 (31.2%) and 51 (27.0%) were current and past consumers of unpasteurized cheeses, respectively.

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, milk, zoonoses.

### **Introdução**

O consumo de leite informal no Brasil é de 32,2% de acordo com o IBGE (2011), Essa porcentagem de consumo de leite e derivados informais é ainda maior em cidades de pequeno porte e periferias de médias e grandes cidades. Um estudo realizado em áreas periurbanas de Juiz de Fora MG revelou taxas de consumo de leite e queijo não inspecionados em 42,0% e 66,5% das residências, respectivamente. Apesar das pesquisas apresentadas sobre consumo de leite e derivados informais, há poucos estudos que direcionam para a questão dos riscos biológicos relacionados a saúde da população consumidora, demonstrando a importância de mais estudos nesta área.

Com esse objetivo e também o de levantar as prevalências de consumo de leite e derivados não pasteurizados, foi feito outro levantamento epidemiológico em populações de alta vulnerabilidade social (pacientes com tuberculose) de Juiz de Fora MG (cidade de aproximadamente 500 mil habitantes).

## Material e Métodos

A população do estudo foi recrutada a partir de dois centros de referência em tuberculose de março de 2008 a fevereiro de 2010. Deve ser ressaltado que pacientes com tuberculose normalmente enfrentam alta vulnerabilidade social. Adicionalmente, a maior parte (98%) da população do município vivia no meio urbano na atualidade.

Os participantes foram esclarecidos sobre os objetivos do estudo e um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foi obtido de todos eles, sendo o estudo aprovado pelo Conselho de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora. Após a exposição dos objetivos do estudo, foi realizada uma entrevista para coletar informações sobre uma série de variáveis relativas a dados clínicos, comportamentais, padrões de consumo de produtos lácteos e tipos de trabalho. Consumos de leite e queijo foram avaliados de acordo com a frequência e modos de preparação antes do consumo (cozidos, pasteurizado ou cru).

## Resultados e Discussão

A Tabela 1 apresenta características descritivas dos 189 indivíduos incluídos no estudo. A maioria (74%) dos entrevistados era do sexo masculino. Uma alta porcentagem deles (32,8%) possuía nível de escolaridade até a quarta série do ensino fundamental, o que mostra um baixo nível de escolaridade. Uma pequena parcela da população (2,1%) vivia em área rural, na atualidade, sendo a sua maioria (88,4%) residente no município de Juiz de Fora. Finalmente, entre os incluídos não houve nenhum participante com idade menor de 17 anos.

**Tabela 1.** Característica descritiva dos indivíduos envolvidos (n = 189), Município de Juiz de Fora, Brasil, 2008–2010.

Característica	n (%)
<b>Sexo</b>	
Masculino	140 (74,0)
Feminino	49 (26,0)
<b>Idade</b>	
< 17	0 (0,0)
17-38	89 (47,1)
> 38	100 (52,8)
<b>Nível de Educação</b>	
4ª série do ensino fundamental	62 (32,8)
5ª a 8ª série do ensino fundamental	53 (28,0)
Ensino médio completo ou incompleto	25 (13,2)
Graduação completa ou incompleta	6 (3,2)
Ignorados	43 (22,8)
<b>Residência</b>	
Juiz de Fora MG	167 (88,4)
Outro Município do Brasil	22 (11,6)
<b>Vivem no momento na área rural</b>	
Sim	4 (2,1)
Não	185 (97,9)

A Tabela 2 apresenta informações sobre os locais de moradia, histórico de empregos relacionados à pecuária e agroindústria de origem animal e taxas de consumo de leite e derivados não pasteurizados entre os 189 entrevistados. Um total de 131 (69,3%) deles nunca viveu em área rural. 65 (34,4%) possuíam histórico de trabalho com pecuária ou agroindústria de origem animal. Sobre o queijo não pasteurizado, foi verificado que 59 (31,2%) e 51 (27,0%) dos entrevistados consumiam o referido alimento no presente e no passado, respectivamente. Relacionado ao leite não pasteurizado, foi verificado que 15

(7,9%) e 72 (38,1%) dos entrevistados o consumiam no presente e no passado, respectivamente.

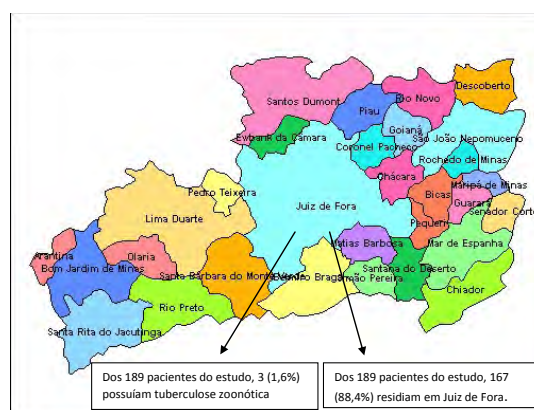
**Tabela 2.** Local de moradia, tipo de trabalho e histórico de consumo de leite e derivados na população do estudo (n = 189), Município de Juiz de Fora , Março 2008 a Fevereiro 2010.

Característica	n (%)
<b>Reside em área rural</b>	
Neste momento	4 (2,6)
No passado	54 (28,6)
Nunca viveu em área rural	131 (69,3)
<b>Histórico de trabalho com pecuária ou agroindústria de origem animal</b>	
Sim	65 (34,4)
Não	67 (35,5)
Ignorado	57 (30,1)
<b>História do consumo de queijo não pasteurizado</b>	
Consumidores atuais	59 (31,2)
Ex-consumidores	51 (27,0)
Nunca consumiram	23 (12,1)
Ignorado	56 (29,7)
<b>História do consumo de leite não pasteurizado</b>	
Consumidores atuais	15 (7,9)
Ex-consumidores	72 (38,1)
Nunca consumiram	46 (24,3)
Ignorado	56 (29,7)

O grande consumo de leite e de queijo não pasteurizados é um reconhecido fator de risco para ocorrência de transmissão de doenças zoonóticas para a população, necessitando de uma atenção maior para esses produtos.

Silva et al (2012), mostraram, entre os 189 pacientes entrevistados no presente estudo, a ocorrência de três casos de tuberculose zoonótica causada por *Mycobacterium bovis* (Figura 1). Dois entre esses casos eram consumidores de queijo não pasteurizados, sendo o último ex-consumidor de produtos não pasteurizados, com atual contato com agroindústria de origem animal (possuía açougue e envolvimento com criação de cabras no meio urbano).

Outro estudo que demonstra o risco de consumo de produtos sem pasteurização foi realizado com leite cru e queijo fresco, provenientes de produtores rurais produzidos às margens do rio Tietê, São Paulo, SP, onde foram endentificados em 43 amostras de queijo fresco 5 (11,63%) de *Brucella* spp e 18 (41,86%) de *Campylobacter* spp. Adicionalmente, das 43 amostras de leite cru analisadas, em uma (5%) foi isolado *Campylobacter* spp., mas nenhuma apresentou *Brucella* spp. (KOBAYASHI,2012).



**Figura 1.** Casos identificados de tuberculose zoonótica em Juiz de Fora – MG, Brasil.

## Conclusões

Foram verificadas altas taxas de consumo de lácteos não pasteurizados em população de alta vulnerabilidade social.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura Citada

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, L. D.; OLIVEIRA, M. E.; RODRIGUES, V. B.; FERNANDES, R. F. Comércio informal de leite e derivados: um problema ainda presente em cidades de médio porte? **Higiene Alimentar**, Brasil, v. 19, n.130, 2005.

SILVA, M. R.; OLIVEIRA, M. E.; OLIVEIRA, L. D.; RODRIGUES, V. B.; FERNANDES, R. F. Segurança alimentar: percepção e atitudes de consumidores de áreas Peri urbanas de Juiz de Fora - MG. **Higiene Alimentar**, Brasil, v. 19, n.130, p. 1-2, 2005.

SILVA, M. R.; ROCHA, A. S.; COSTA, R. R.; ALENCAR, A. P.; OLIVEIRA, V. M.; FONSECA JÚNIOR, A. A.; SALES, M. L.; ISSA, M. L.; FILHO, P. M. S.; PEREIRA, O. T. V.; SANTOS, E. C.; MENDES R. S.; FERREIRA, A. M. J.; MOTA, P. M. P. C.; SUFFYS, P. N.; GUIMARÃES, M. D. C. **Tuberculosis patients co-infected with *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis* in an urban area in Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, no prelo, 2012.

KOBAYASHI P. F. **Monitoramento dos principais agentes zoonóticos em leite de origem clandestina, provenientes de animais criados às margens do rio Tietê**. Dissertação apresentada ao Instituto Biológico, da Agência Paulista de Tecnologia do Agronegócio, para obtenção do título de Mestre em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio. São Paulo 2012.



# **Infecções humanas por *Mycobacterium bovis* no Brasil: avaliação de fatores de risco**

## **Human infections with *Mycobacterium bovis*: risk factors in Brazil**

Marcio Roberto Silva<sup>1</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>1</sup>, Ronaldo Rodrigues Costa<sup>2</sup>, Flávio Ribeiro Araújo<sup>3</sup>, Samuel Miguel Hylario<sup>4</sup>, Bernardo Barbosa Rocha<sup>5</sup>, Maria Aparecida Scatamburlo Moreira<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite,

<sup>2</sup>Bioquímico Hospital Regional João Penido. Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais,

<sup>3</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Corte,

<sup>4</sup>Bolsista Fapemig,

<sup>5</sup>Mestrando em Veterinária, Universidade Federal de Viçosa,

<sup>6</sup>Professora da Universidade Federal de Viçosa.

**Resumo:** Este estudo teve como objetivo avaliar os possíveis fatores associados a co-infecções de *M. bovis* por meio de um estudo de caso-controle aninhado em um estudo transversal. No estudo transversal, que definiu quais micobactérias estavam envolvidas, houve a participação de 189 pacientes com tuberculose. Destes, três (1,6%) apresentaram co-infecções *M. bovis*-*M. tuberculosis*. As co-infecções por *M. bovis* foram associadas ( $p \leq 0,05$ ) tanto ao consumo de queijo não pasteurizado acima de níveis medianos (OR = 4,0), como à exposição zoonótica (OR = 5,7) e também à forma clínica de tuberculose extrapulmonar (OR = 7,8).

**Palavras-chave:** *Mycobacterium bovis*, fatores de risco, leite e derivados.

**Abstract:** This study aimed to evaluate the possible factors associated respectively with co-infections of *M. bovis* through a case-control study nested in a cross-sectional study. In cross-sectional study, which defined which mycobacteria were involved, there was the participation of 189 patients with tuberculosis. Of these, three (1.6%) had co-infections *M. bovis*-*M. tuberculosis*. The co-infections caused by *M. bovis* were associated ( $p \leq 0.05$ ) with the consumption of cheese not pasteurized above median levels (OR = 4.0), the zoonotic exposure (OR = 5.7) and also the clinical form of extrapulmonary tuberculosis (OR = 7.8).

**Keywords:** *Mycobacterium bovis*, risk factors, milk.

## **Introdução**

Embora a maioria dos casos de tuberculose humana (TB) sejam causados por *Mycobacterium tuberculosis*, preocupações com *Mycobacterium bovis* tem sido expressas e baseiam-se em várias observações. Primeiro, houve surtos de TB por cepas de *M. bovis* multidroga resistentes (MDR) entre pacientes hospitalizados portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SAMPER et al. 1997). Estes surtos destacam o alto risco que *M. bovis* MDR pode se espalhar, especialmente em partes da África, onde animais com *M. bovis* e humanos com HIV co-existem. Em segundo lugar, o ressurgimento da tuberculose zoonótica entre os imigrantes de regiões onde a tuberculose bovina ainda é prevalente foram documentados (DANKNER et al. 1993).

Na América Latina, a proporção estimada de tuberculose zoonótica devida a *M. bovis* foi de 2% e 8% das formas pulmonar (PTB) e extrapulmonares (TBEP) de TB, respectivamente (COSIVI et al. 1998), enquanto que no Brasil, a proporção de casos devidos a *M. bovis* foi estimada em 3,5% de todos os casos de TB em 1974 (CORRÊA & CORRÊA, 1974). Como procedimento padrão, microscopia direta de escarro e histopatologia são os principais critérios para o diagnóstico da tuberculose no Brasil, que podem ignorar os casos zoonóticos potenciais de TB em áreas endêmicas do país. Este

potencial é reforçado uma vez que de acordo com o Ministério da Agricultura 0,85% do gado no estado de Minas Gerais (MG), Brasil, demonstrou ser reagente na prova de tuberculina.

Este estudo teve como objetivo avaliar os possíveis fatores associados respectivamente a co-infecções de *M. bovis* por meio de um estudo de caso-controle aninhado em um estudo transversal. No estudo transversal, que definiu quais micobactérias estavam envolvidas, houve a participação de 189 pacientes com TB. Destes, três (1,6%) apresentaram co-infecções *M. bovis*-*M. tuberculosis*.

## Material e Métodos

O estudo transversal foi conduzido em dois centros de saúde em Minas Gerais, Brasil, de março de 2008 a fevereiro de 2010.

Como casos foram definidos os pacientes que apresentaram evidências de *M. bovis*, e como controles aqueles que apresentaram somente *M. tuberculosis*. Foram selecionados 15 controles (TB por *M. tuberculosis*) para cada co-infecção por *M. bovis*. Os controles foram pareados por faixa etária ( $\pm 10$  anos), sexo e tipo de agravo (tanto casos como controles possuíam TB).

## Resultado e Discussão

A Tabela 1 descreve os três casos que apresentaram tuberculose zoonótica por *M. bovis*. No estudo, de acordo com a tabela 2, co-infecções por *M. bovis* foram associadas ( $p \leq 0,05$ ) tanto ao consumo de queijo não pasteurizado acima de níveis medianos (OR = 4,0), como à exposição zoonótica (OR = 5,7) e também à forma clínica de tuberculose extrapulmonar (OR = 7,8).

Verificou-se uma alta taxa de consumo (44%) de queijo não pasteurizado, entre os indivíduos neste estudo. Dois (11,7%) de 17 com TB extrapulmonar, residentes em Juiz de Fora - MG e um (0,6%) dos 170 pacientes com tuberculose pulmonar, residente em Leopoldina - MG apresentaram perfil de *M. bovis*. (Figura 1).

Possíveis fontes de infecção de *M. bovis* foram queijos não pasteurizados, criação de cabras ou ocupações com matadouros. Assim, os riscos potenciais para a saúde de microrganismos zoonóticos veiculados por leite e derivados, incluindo *M. bovis*, deve ser enfatizado.

**Tabela 1.** Características comparativas dos pacientes que apresentaram evidências de *M. bovis*.

Característica	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Forma de tuberculose	Pleuro-pulmonar	Ganglionar	Pulmonar
Idade (anos)	20	50	33
Pecuária e agroindústria	Nunca	Nunca	Pecuária urbana – cria cabras no próprio quintal e possui açougue na família
Queijo não pasteurizado	Consumidor atual	Consumidor atual	Ex-consumidora
Diagnóstico de HIV	Negativo	Negativo	Negativo

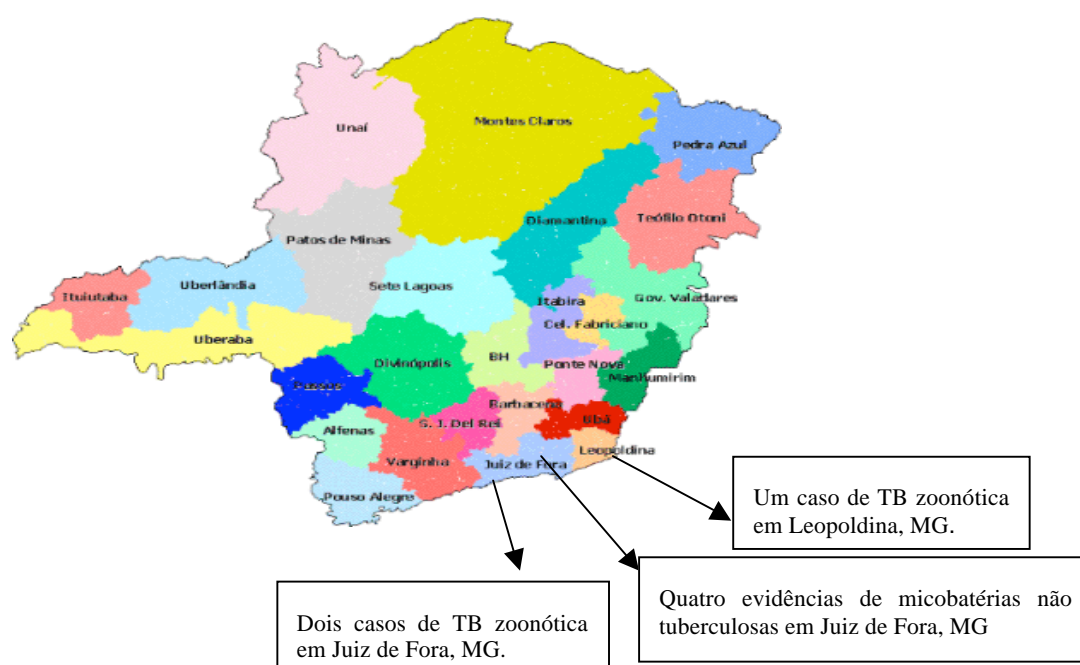
**Tabela 2.** Fatores associados à infecção por *M. bovis*.

Fator	OR MH <sup>***</sup> (IC 95% Mid-P exato)	Valor de p
Consumo de queijo não pasteurizado acima de níveis medianos <sup>**</sup> (Sim)	4,0 (2,3 - indefinido)	Mid-P exato ajustado < 0,01 <sup>*</sup>
Exposições Zoonóticas <sup>**</sup> (Sim)	5,7 (2,8 - indefinido )	Mid-P exato ajustado < 0,01 <sup>*</sup>
Formas clínicas de TB <sup>**</sup> (extrapulmonar)	7,8 (3,9 - 983)	Mid-P exato ajustado < 0,001 <sup>*</sup>
Consumo de leite não pasteurizado acima de níveis medianos (Sim)	-	Mid-P exato ajustado = 0,34 <sup>*</sup>
HIV/Aids (Sim)	-	Mid-P exato ajustado = 0,70 <sup>*</sup>
Vacina BCG (Sim)	-	Mid-P exato ajustado = 0,70 <sup>*</sup>

<sup>\*</sup>Fisher ou Mid-P exato são recomendados mais que chi quadrado

<sup>\*\*</sup>Correção de Haldane

<sup>\*\*\*</sup>Odds ratio Mantel Haenszel



**Figura 1.** Localização dos casos de tuberculose zoonótica e micobactérias não tuberculosas no estado de Minas Gerais, Brasil.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura Citada

CORRÊA C. N. M.; CORRÊA W. M. Tuberculose Humana por bacilo bovino em São Paulo, Brasil. *Arq Inst Biol*, 1974; 41:131-134.

COSIVI O.; GRANGE J. M.; DABORN C. J.; et al. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in Developing Countries. *Emerg Infect Dis*, 1998; 4: 59-70.

SAMPER S.; MARTÍN C.; PINEDO A.; et al. Transmission between HIV-infected patients of multidrug-resistant tuberculosis caused by *Mycobacterium bovis*. **AIDS** 1997; 11:1237-1242

DANKNER W. M.; WAECKER N. J.; ESSEY M. A.; MOSER K.; THOMPSON M.; DAVIS C. E. *Mycobacterium bovis* infections in San Diego: a clinic epidemiologic study of 73 patients and a historical review of a forgotten pathogen. **Medicine** 1993; 72:11-37.

# Diagnóstico molecular de doenças genéticas em bovinos da raça Gir<sup>1</sup>

## Molecular diagnosis of genetic diseases in Gir cattle

Lorena Evangelista Fernandes<sup>2</sup>, Karina Braz Bernardo<sup>3</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis<sup>4</sup>, Rui da Silva Verneque<sup>5</sup>, Marco Antonio Machado<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Parte do trabalho de conclusão de curso da primeira autora, financiado pelo CNPq

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas – CES/JF. Bolsista do CNPq. e-mail: lorenafernandes2@gmail.com

<sup>3</sup>Mestranda em Genética e Melhoramento - UFV. e-mail: karinudsbernardo@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite. e-mail: danielle.reis@embrapa.br

<sup>5</sup>Embrapa Gado de Leite. e-mail: rui.verneque@embrapa.br

<sup>6</sup>Embrapa Gado de Leite. e-mail: marco.machado@embrapa.br

**Resumo:** Esse trabalho descreve os resultados obtidos a partir do diagnóstico molecular para três doenças autossômicas recessivas em bovinos da raça Gir. Os testes foram realizados em 416 touros Gir para o Complexo de Má Formação Vertebral (CVM), a Deficiência Leucocitária Bovina (BLAD) e para a Deficiência de Uridina Monofosfato Sintetase (DUMPS). O DNA dos indivíduos foi extraído, quantificado e armazenado na concentração de 20 ng/μL e mantido a -20 °C até sua utilização na PCR para a amplificação dos fragmentos. Nos casos de BLAD e DUMPS o produto amplificado foi submetido à digestão enzimática. O diagnóstico foi dado a partir da análise da imagem dos fragmentos em gel de poliacrilamida 8%. Nenhum animal foi identificado como portador dos alelos responsáveis pelas doenças testadas. Estes resultados mostram que os touros do PNMGL não contribuem com a disseminação de alelos mutantes para essas doenças.

**Palavras-chave:** BLAD, CVM, DUMPS, genotipagem, melhoramento.

**Abstract:** This study reports the molecular diagnosis results of three autosomal recessive diseases in Gir cattle. Four hundred and sixteen bulls were tested for Complex Vertebral Malformation (CVM), Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency (BLAD) and Deficiency of Uridine Monophosphate Synthase (DUMPS). The DNA was extracted, quantified, diluted to 20 ng/μL and stored at -20 °C until PCR analyses. For BLAD and DUMPS the amplified PCR products were digested with restriction enzyme. The diagnoses were made using separation of DNA fragments in 8% native polyacrylamide gel. No animal were identified as carrier for the alleles related to the studied diseases. These results show that the proven sires of Gir Dairy Cattle do not contribute to the dissemination of mutant alleles of these diseases.

**Keywords:** BLAD, CVM, DUMPS, genotyping, animal breeding.

## Introdução

Nos últimos anos a bovinocultura brasileira tem investido em programas de melhoramento genético nos últimos anos a fim de impulsionar o aumento da eficiência nos sistemas de produção. O Programa Nacional de Melhoramento Genético do Gir Leiteiro (PNMGL) foi criado há 27 anos com o objetivo de promover o melhoramento genético da raça Gir para características de produção, manejo, conformação, dentre outras, através da seleção de animais geneticamente superiores. O Complexo de Má Formação Vertebral (CVM), a Deficiência Leucocitária Bovina (BLAD) e a Deficiência de Uridina Monofosfato Sintetase (DUMPS) são doenças caracterizadas como autossômicas recessivas, ou seja, são letais quando o alelo contendo a mutação está presente em homozigose. O complexo de CVM é uma doença causada por uma mutação pontual (Guanina/Timina) na posição 559 do gene SLC35A3. A deficiência de BLAD se caracteriza por ser provocada por duas mutações pontuais no gene CD18, onde uma delas ocorre no nucleotídeo 383

(Adenina/Guanina) e a outra no nucleotídeo 775 (Citosina/Timina). Já a DUMPS é causada pela troca de Citosina por Timina no códon 405 do gene UMPS. A presença de genes relacionados a CVM, BLAD e DUMPS é responsável por perdas significativas na produção de rebanhos leiteiros de raças européias. Conhecendo a base molecular dessas doenças, é possível detectar diretamente seus portadores a nível genético, através de análise genômica, impedindo a reprodução desse animal, a disseminação de genes indesejados e as consequentes perdas na produtividade do rebanho. Portanto o objetivo deste trabalho foi realizar as genotipagens de animais Gir para o CVM, BLAD e para DUMPS para a inclusão no PNMGL.

## Material e Métodos

O DNA de 416 touros participantes do programa foi extraído a partir de amostras de sangue ou sêmen utilizando um protocolo adaptado das técnicas de Sambrook e Russel (2001). A quantificação do material extraído foi feita com o auxílio de um espectrofotômetro e a partir dos dados obtidos foram feitos cálculos de diluição a fim de padronizar a concentração de DNA nas amostras para 20 ng/ $\mu$ L.

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar os genes de interesse para CVM, BLAD e DUMPS, utilizando os *primers* descritos por Ghanem et al. (2008), Shuster et al. (1992) e Schwenger et al. (1993), respectivamente. Para CVM foram feitas duas amplificações por PCR, sendo uma para o gene normal e outra para o gene mutante. O material amplificado para análise de BLAD e DUMPS foi submetido à ação de enzimas de restrição, responsáveis por cortar a fita de DNA em pontos específicos produzindo fragmentos de tamanhos distintos, diferenciando os alelos normais e mutantes. Para BLAD o produto da PCR foi digerido utilizando a enzima Hae III (SHUSTER et al., 1992) e para DUMPS foi utilizada a enzima Ava I (SCHWENGER et al., 1993). O diagnóstico foi dado a partir da análise da imagem dos fragmentos obtida por eletroforese em gel de poliacrilamida 8%.

De acordo com Shuster et al. (1992) para o diagnóstico de BLAD, os fragmentos obtidos da digestão enzimática, para os indivíduos portadores do alelo mutante (heterozigotos) possuem 49, 30, 19 e 9 pares de base (pb). Para os que não portam a mutação, os fragmentos obtidos são de 49 e 9 pb (Tabela 1). Animais portadores da doença DUMPS, como descrito por Schwenger et al. (1993), apresentam fragmentos de 89, 53, 36 e 19 pb, após a digestão enzimática. Para animais que não possuem o alelo mutante, os fragmentos encontrados possuem 53, 36 e 19 pb (Tabela 2). O diagnóstico de CVM é feito pela análise da presença ou ausência do alelo mutante nos indivíduos, como descrito por Ghanem et al. (2008) (Tabela 3).

**Tabela 1.** Padrões dos fragmentos digeridos para diagnóstico de BLAD.

Genotipagem	Fragmento	Fragmento	Fragmento	Fragmento
Normal	49 pb	-	-	9 pb
Portador	49 pb	30 pb	19 pb	9 pb

Pb = pares de bases

**Tabela 2.** Padrões dos fragmentos digeridos para diagnóstico de DUMPS.

Genotipagem	Fragmento	Fragmento	Fragmento	Fragmento
Normal	-	53 pb	36 pb	19 pb
Portador	89 pb	53 pb	36 pb	19 pb

Pb = pares de bases

**Tabela 3.** Padrões dos fragmentos amplificados para diagnóstico de CVM.

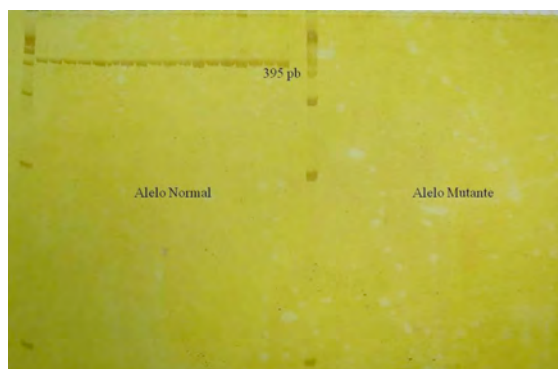
Genotipagem	Alelo Normal	Alelo Mutante
Normal	395 pb	-
Portador	395 pb	395 pb

Pb = pares de bases

## Resultados e Discussão

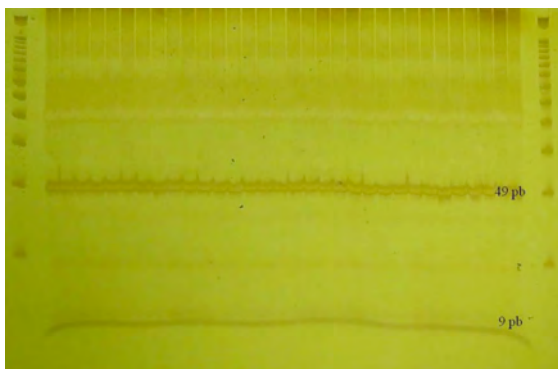
Foram genotipados 416 animais para cada uma das doenças e nenhum foi diagnosticado como portador de CVM, BLAD ou DUMPS. Os geis foram analisados com o auxílio de um transiluminador convencional.

Em testes para a portabilidade da mutação no gene SLC35A3, responsável pela doença CVM, não foi observada a presença do alelo mutante, como exemplificado na Figura 1.



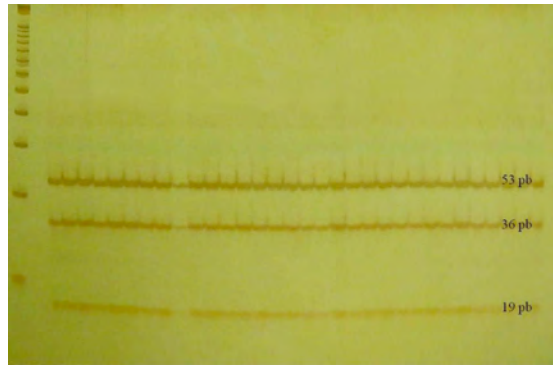
**Figura 1.** Genotipagem do gene SLC35A3 para diagnóstico de CVM. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Marcador de peso molecular de 100 pb.

Para BLAD nenhum animal apresentou o gene CD18 contendo a mutação responsável pela doença. Portanto não foram observados fragmentos com 30 pb e 19 pb, apenas os de 49 pb e 9 pb (Figura 2).



**Figura 2.** Genotipagem do gene CD18 para diagnóstico de BLAD. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Marcador de peso molecular de 25 pb.

A identificação de animais portadores da mutação responsável pela doença DUMPS, é dada pela presença de um fragmento de 89 pb, 53 pb, 36 pb e 19 pb. Assim, não foram observados animais portadores da mutação, portanto os fragmentos presentes eram de 53 pb, 36 pb e 19 pb, como mostrado na Figura 3.



**Figura 3.** Genotipagem do gene UMPS para diagnóstico de DUMPS. Eletroforese em gel de poliacrilamida 8%. Marcador de peso molecular de 25 pb.

### Conclusões

A aplicação das técnicas de diagnóstico molecular para doenças evita a disseminação de genes indesejados em rebanhos comerciais. Assim seu controle pode ser feito selecionando reprodutores não portadores, evitando a produção de descendentes doentes ou portadores silenciosos e consequentes perdas na produção.

A seleção de animais com genótipos favoráveis mostra-se eficiente nos casos das doenças estudadas. A ausência de animais portadores das doenças CVM, BLAD e DUMPS representa parte dos objetivos do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro.

### Agradecimentos

A Fapemig

Ao CNPq pela concessão de bolsa e apoio financeiro e a Embrapa Gado de leite.

### Literatura Citada

GHANEM, M. E.; AKITA, M.; SUZUKI, T.; KASUGA, A.; NISHIBORI, M. Complex vertebral malformation in Holstein cows in Japan and its inheritance to crossbred F1 generation. **Animal Reproduction Science**, v. 103, p. 348–354, 2008.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SCHWENGER, B.; SCHÖBER, S.; SIMON, D. Dumps cattle carry a point mutation in the uridine monophosphate synthase gene. **Genomics**, v. 16, p. 241-244, 1993.

SHUSTER, D. E.; KEHRLI JUNIOR, M. E; ACKERMANN, M. R.; GILBERT, R. O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 89, p. 9225-9229, 1992.



# Duplicação cromossômica em híbridos interespecíficos entre capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e milheto (*Pennisetum glaucum*).

Carolina de Souza Fonseca<sup>1</sup>, Ana Luisa Sousa Azevedo<sup>2</sup>, Juliane Dornellas Nunes<sup>3</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>2</sup>, Francisco José da Silva Ledo<sup>2</sup>, Antônio Vander Pereira<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduanda de Ciências Biológicas, CES/JF. cacasfonseca@yahoo.com.br.

<sup>2</sup>Embrapa – Gado de Leite, Rua Eugênio do Nascimento, 610, 36038-330 Juiz de Fora (MG), Brasil.

<sup>3</sup>Pós-doutoranda da Embrapa Gado de Leite.

**Resumo:** Híbridos entre capim elefante, *Pennisetum purpureum* ( $2n = 4x = 28$ ) e milheto, *Pennisetum glaucum* ( $2n = 2x = 14$ ) têm grande importância no melhoramento genético de *Pennisetum*. A esterilidade do híbrido triploide ( $2n = 3x = 21$ ) limita sua utilização e impede a produção de sementes para a implantação de pastagens. A restauração da fertilidade dos híbridos pode ser conseguida através de duplicação cromossômica usando a colchicina. Neste trabalho foram testados seis tratamentos, com colchicina nas concentrações de 0,1 e 0,2%. Os tempos de exposição variaram de 1 a 3 horas. Foram utilizadas sementes do híbrido triploide, cujos pais são o capim elefante (cv. Pioneiro) e milheto 8. A determinação da ploidia das plantas foi realizada por citometria de fluxo. A taxa de sobrevivência das plantas após os tratamentos foi baixa, em torno de 8 a 30%. Os resultados evidenciaram que nos tratamentos com menor tempo de exposição à colchicina e concentração mais baixa, a taxa de sobrevivência das plantas foi mais elevada. No presente trabalho a obtenção de hexaploides foi possível em todos os tratamentos realizados, exceto na concentração 0,2% por 1 hora. Foi constatada a frequente ocorrência de plantas mixoploides em todos os tratamentos. A instabilidade genômica, associada aos processos de poliploidização e hibridação interespecífica foram observadas nos híbridos aqui analisados. Os tratamentos testados foram eficientes para indução de duplicação cromossômica. No entanto, apesar das baixas concentrações utilizadas há uma taxa de mortalidade alta durante o processo.

**Palavras chave:** colchicina, manipulação de ploidia, citometria de fluxo.

**Abstract:** Hybrids between napier grass, *Pennisetum purpureum* ( $2n = 4x = 28$ ) and pearl millet, *Pennisetum glaucum* ( $2n = 2x = 14$ ) have great importance in *Pennisetum* genetic breeding. The triploid hybrid ( $2n = 3x = 21$ ) sterility limits its use and prevents the seeds production for pastures deployment. The fertility restoration of these hybrids can be achieved through chromosome duplication using colchicine. In this work were tested six treatments with colchicine, at 0.1% and 0.2% concentrations. Exposure times ranged from 1 hour to 3 hours. Triploid hybrid seeds used whose parents are napier grass (Pioneiro cv.) and pearl millet 8. The ploidy screening of plants was performed by flow cytometry. The survival rate of plants after treatments was low, around 8 to 30%. The results showed that treatments with less time of exposure to colchicine and lower concentration, the survival rate of plants was higher. In this work was possible obtaining hexaploid in all treatments except the 0.2% concentration for 1 hour. Was found frequent occurrence of mixoploids plants in all treatments. The genomic instability, associated with the processes of interspecific hybridization and polyploidy were observed in the hybrids analyzed here. The treatments tested were effective for induction of chromosome duplication. However, despite the low concentrations used there is a high mortality rate during the process.

**Key words:** colchicine, ploidy manipulation, flow cytometry.

## Introdução

No melhoramento genético de *Pennisetum*, a hibridação interespecífica entre o capim elefante (*Pennisetum purpureum*) e o milheto (*Pennisetum glaucum*) é uma das alternativas para a obtenção de cultivares superiores. A reunião no híbrido de características dos parentais é a principal vantagem desse processo. No milheto a qualidade da forragem, tolerância à seca e resistência às doenças são atrativos para os melhoristas, e no capim elefante, a rusticidade, agressividade, perenidade e a elevada produção de matéria seca são as principais características a serem herdadas (DIZ, 1994).

O capim-elefante é uma espécie alotetraploide ( $2n=4x=28$  cromossomos), enquanto o milheto é diploide ( $2n=2x=14$  cromossomos). O híbrido capim elefante x milheto é triploide e estéril, com  $2n=3x=21$  cromossomos, apresenta o genoma AA'B (TECHIO et al., 2005). A esterilidade do híbrido compromete a produção de sementes viáveis e consequentemente dificulta o uso desses híbridos nos programas de melhoramento, devido à impossibilidade de realização de cruzamentos. A restauração da fertilidade pode ser alcançada através da duplicação cromossômica, via exposição a agentes antimitóticos, tais como a colchicina, obtendo-se híbridos hexaploides com  $2n=6x=42$  cromossomos. O objetivo deste trabalho foi descrever um método eficiente de utilização da colchicina em sementes triploides de híbridos entre capim elefante e milheto para a produção de híbridos hexaploides e sua identificação por meio da citometria de fluxo.

## Material e Métodos

O trabalho foi conduzido na Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora - MG, no período de março de 2012 a fevereiro de 2013. Para obtenção das sementes triploides foram utilizados a cultivar Pioneiro de capim-elefante, como parental masculino, e o milheto 8 pertencente ao Banco de Germoplasma de Capim Elefante da Embrapa Gado de Leite, como parental feminino.

As sementes de milheto foram plantadas em copos plásticos de 500 mL contendo uma mistura de substrato e terra, totalizando 30 copos. Foram transplantadas para o campo, com espaçamento 0,3 m entre plantas e 0,8 m entre linhas, para posterior realização dos cruzamentos interespecíficos.

As inflorescências foram selecionadas antes da abertura da flor (estádio de "emborrachamento") e protegidas com sacos de papel, de modo que a ocorrência de cruzamentos naturais ficasse impedida. No momento em que os estigmas estavam receptivos, o pólen foi coletado do parental masculino e colocado sobre os estigmas do parental feminino, sendo mantidas as proteções das inflorescências até a colheita das sementes.

As sementes produzidas foram colhidas e armazenadas em câmara climática, sob condições controladas de umidade e temperatura sob 28 °C, regime de 12 horas luz/12 horas escuro. Foram utilizadas 400 sementes, as mesmas foram separadas em caixas do tipo gerbox, contendo 100 sementes. As sementes germinadas foram então tratadas com solução aquosa de colchicina nas concentrações 0,1% e 0,2%, durante 1, 2 ou 3 horas de exposição. As plântulas sobreviventes após os tratamentos com colchicina foram plantadas em tubetes contendo substrato e mantidas em casa de vegetação e posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

As análises por citometria de fluxo foram realizadas no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite de Juiz de Fora. Foram preparadas duas amostras por planta para a esta análise. O tecido foliar jovem de cada amostra foi triturado, junto com a mesma quantidade de tecido foliar de soja, *Glycine max*, (padrão interno de referência), com 1mL de tampão LBO1 gelado para a obtenção da suspensão nuclear. O tecido triturado foi aspirado e filtrado. Foram adicionados iodeto de propídeo e RNase à suspensão nuclear. Para cada amostra foram analisados em média 10 mil núcleos.

A análise foi realizada no citômetro Facscalibur (Becton Dickinson), sendo os histogramas obtidos no *software Cell Quest* e analisados no *software WinMDI 2.9* (disponível em <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg)

das plantas foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência (*Glycine max*).

## Resultados e Discussão

A taxa de sobrevivência de plantas após trinta dias da realização dos tratamentos de indução de duplicação cromossômica foi baixa, variando entre 8,20 e 30%, conforme a Tabela 1. Os resultados evidenciaram que nos tratamentos com menor tempo de exposição à colchicina e concentração mais baixa, a taxa de sobrevivência das plantas foi mais elevada. O tratamento A1, no qual as plântulas permaneceram na concentração de 0,1% de colchicina durante uma hora apresentou a maior taxa de plantas sobreviventes, no entanto não foi o tratamento com maior obtenção de plantas hexaploides.

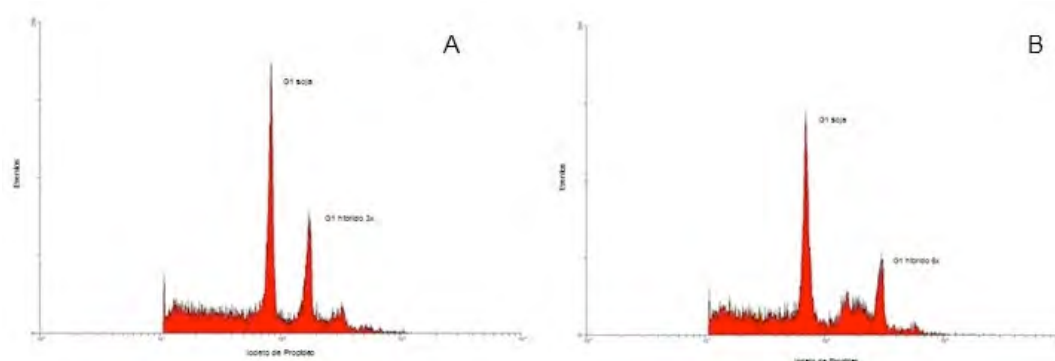
**Tabela 1.** Resultados após indução de duplicação cromossômica com utilização de colchicina em sementes triploides do híbrido interespecífico (Pioneiro x Milheto 8).

Tratamento	Sementes tratadas	Plantas obtidas após tratamento	Conteúdo de DNA (pg)	Plantas sobreviventes após 30 dias (%)	Hexaploides obtidos (%)
A1	60	49	5,07 - 11,38	30,0%	1,7%
A2	60	55	4,18 - 12,09	23,3%	5,0%
A3	48	44	5,02 - 11,67	29,2%	2,1%
B1	46	36	5,06 - 10,64	15,2%	zero
B2	61	53	5,27 - 11,47	8,2%	1,6%
B3	54	50	5,18 - 13,57	11,1%	3,7%

Tratamentos A1, A2, A3 = Colchicina na concentração 0,1%, durante 1, 2 e 3 horas, respectivamente.

Tratamentos B1, B2, B3 = Colchicina na concentração 0,2%, durante 1, 2 e 3 horas, respectivamente.

De acordo com Nunes et al. (2011) os tratamentos com baixas concentrações de colchicina em híbridos interespecíficos triploides de capim elefante x milho permitiram melhor desenvolvimento e sobrevivência das plantas e foram eficientes na obtenção de plantas hexaploides. No presente trabalho a obtenção de hexaploides foi possível em todos os tratamentos realizados, exceto na concentração 0,2% por 1 hora (B1). A maior taxa de duplicação cromossômica foi obtida no tratamento A2. O conteúdo médio de DNA observado nas plantas triploides e hexaploides está em acordo com a literatura (Figura 1). Segundo Martel et al. (1997) o capim-elefante apresenta quantidade de DNA de 4,59 pg e o milho de 4,71pg. O híbrido triploide deveria ter a média entre os parentais, ou seja 4,65 pg, com uma previsão de quantidade de DNA após duplicação cromossômica de 9,30 pg.



**Figura 1.** (A) híbrido triploide com 5,16 pg de DNA, (B) híbrido hexaploide com 10,55 pg de DNA.

Na análise dos histogramas foi constatada a frequente ocorrência de plantas mixoploides em todos os tratamentos. A eliminação de cromossomos e a consequente mixoploidia é um fenômeno comumente observado em combinações híbridas (BARBOSA et al., 2007). Uma série de alterações genômicas tem sido associada com os eventos de hibridação interespecífica e alopoliploidização, que ocorrem devido à nova constituição genômica dos híbridos.

A instabilidade genética e genômica, comumente associada aos processos de poliploidização e hibridação interespecífica, podem estar associadas a problemas de desenvolvimento e à instabilidade meiótica com, consequências para a produção de sementes viáveis (COMAI, 2000). A presença de genótipos com grande variação na quantidade de DNA é indesejável nas plantas hexaploides de capim elefante x milheto. A estabilização genômica no nível 6x de ploidia é favorável ao aumento da produção de sementes viáveis e consequente aumento do poder de germinação das mesmas.

### **Conclusões**

Os tratamentos com concentração de colchicina 0,1% e 0,2% foram eficientes para indução de duplicação cromossômica. No entanto, apesar das baixas concentrações utilizadas há uma taxa de mortalidade alta durante o processo.

### **Agradecimentos**

Ao CNPq, Fapemig e Unipasto pelo apoio financeiro ao projeto.

### **Literatura Citada**

BARBOSA, S; DAVIDE, L. C.; PEREIRA, A. V.; ABREU, J. C. Duplicação cromossômica de híbridos triploides de capim-elefante e milheto. **Bragantia**, Campinas, v. 66, n. 3, 365-372, set. 2007.

COMAI, L. Genetic and epigenetic interaction in allopolyploid plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 387-399, 2000.

DIZ, D.A. **Breeding procedures and seed production management in pearl millet x elephant grass hexaploids hybrids**. 118 p. Tese (Doutorado) - University of Florida, Gainesville, 1994.

MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV, S.; BROWN, S.; SARR, S. Genome size variation and basic chromosome number in pearl millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of Heredity**, v. 88, p. 139-143, 1997.

NUNES, J.D.; AZEVEDO, A.L.S.; LÉDO, F.J.S.; VANDER, A.V.; FONSECA, E.M.; SILVA, T.A. **In vivo Genomic duplication of interspecific hybrids from Napier Grass and Pearl millet**. 57<sup>a</sup> Congresso Brasileiro de Genética, 2011, Águas de Lindóia, SP. Anais.

TECHIO, V. H., DAVIDE, L. C., PEREIRA, A. V. Genomic analysis in *Pennisetum purpureum* x *P. glaucum* hybrids. **Caryologia**, Vol. 58, nº 1: 28-33. 2005.

# Identificação e Recuperação Automática de SNPs

## Representing Automatic Identification and Retrieval of SNPs

Leonardo Carvalho Nápolis Costa<sup>1</sup>, Leonardo Gravina<sup>2</sup>, Camilo Falcão<sup>3</sup>, Wagner Arbex<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduando de Sistemas de Informação. Bolsista de ICT – Fapemig. E-mail: leonardocnc@gmail.com

<sup>2</sup>Mestrando Graduação em Ciência da Computação, E-mail: leograv@gmail.com

<sup>3</sup>Mestrando em Ciência da Computação, E-mail: camilofalcao@gmail.com

<sup>4</sup>Doutor em Engenharia de Sistemas e Computação. Embrapa Gado de Leite. E-mail: wagner.arbex@embrapa.br

**Resumo:** Este trabalho descreve o desenvolvimento de uma aplicação para identificação e recuperação automática de SNPs. A aplicação foi desenvolvida com o uso da linguagem de programação *Perl* e auxílio de um dos seus projetos que inclui vários módulos, *BioPerl* para comunicar-se com as bases de dados do web site NCBI. Com esses recursos, foi possível recuperar e identificar dados onde apresentam possíveis SNPs segundo os *softwares* usados para identificá-los e com grande grau de automação, evitou-se a intervenção manual direta sobre as ferramentas oferecidas pela NCBI. Ao longo do desenvolvimento da estrutura e o uso dos procedimentos pelos materiais usados chegou-se a conclusão de pode-se tirar ótimo proveito da aplicação desenvolvida e ser usada para trabalhos futuros.

**Palavras-chave:** SNPs, NCBI, *Perl*, ferramentas, Blast, aplicações.

**Abstract:** This paper describes the development of an application for automatic retrieval and identification of SNPs. The application was developed using the Perl programming language and of one of its modules, BioPerl to communicate with the databases of the NCBI web site. With these features, it was possible to recover and identify where data indicate possible SNPs according to the software used to identify them and with a high degree of automation, avoiding direct manual intervention with the tools provided by NCBI. Throughout the development of the structure and use of procedures for the materials used came to the conclusion that is a great advantage using the application developed and it will be useful for future work.

**Keywords:** SNPs, NCBI, Perl, tools, Blast, applications.

## Introdução

Existem diversas ferramentas disponíveis e processos distintos na busca de informação no estudo da área de bioinformática, existe dificuldade de agrupar e organizar dados, e poucas formas de recuperação e identificação das mesmas, por isso existe a necessidade de centralizá-las com o uso de uma aplicação. Esta foi desenvolvida utilizando a linguagem de programação Perl com auxílio do módulo *BioPerl*, pôde fazer pesquisas na base de dados do NCBI. São gerados dois arquivos, onde um possui dados de sequenciamento genético de diversos animais e outro com estes valores estimados.

O objetivo inicial é criar um aplicação padrão para recuperação e identificação de SNPs em determinados animais, assim posteriormente validar os resultados obtidos.

Com o objetivo alcançado, utiliza-se apenas uma aplicação para realizar diversos recursos oferecidos pela NCBI, facilitando a execução de tarefas para obter resultados e validando informação sobre bioinformática.

## Material e Métodos

Para o desenvolvimento desta aplicação foram utilizado diversos materiais. Primeiramente aprofundou-se conhecimento sobre SNPs para entender melhor os *software* *PolyBayes* e *PolyPhred*, e também o *fuzzyMorphic*. Houve pesquisa sobre o NCBI, e

realizados vários testes com o módulo *BioPerl* para buscar informações a partir dos serviços oferecidos pela NCBI.

Para compreensão de um SNP (*single nucleotide polymorphism*), em português polimorfismo de base única, entenda-se como uma alteração de pares de base genômicas que podem ajudar a distinguir espécies ou um pequeno conjunto de indivíduos dos demais indivíduos em uma população (LEHNINGER, NELSON, COX, 2008). Algumas vezes os SNPs estão associados à características como susceptibilidade a drogas ou até mesmo à resistência a doenças (WEAVER, 2012). Apenas as trocas de bases que possuem frequência superior a 1% são consideradas polimorfismos, sendo as outras trocas consideradas mutações (ARAÚJO et. al. 2009).

Entendendo um pouco o conceito de SNP, facilita a compreensão dos *softwares PolyBayes* e *PolyPhred*. Esses dois programas são referências na descoberta de SNPs por modelos computacionais, destacando-se por sua ampla utilização. Ambos foram utilizados no Projeto Genoma Humano (ARBEX, 2009) e trabalham com diferentes metodologias, sobre diferentes atributos. O *Polybayes* foi desenvolvido pelo Centro de Sequenciamento de Genomas, no Departamento de Genética da Escola de Medicina da Universidade de Washington. Pode trabalhar integrado ou independente aos programas *Phred*, *Phrap* e *Consed*. O procedimento de detecção do *Polybayes* utiliza um algoritmo de análise bayesiana (ARBEX, 2009). O *PolyPhred* foi desenvolvido no Departamento de Biotecnologia Molecular da Universidade de Washington e está atualmente na versão 6.18. Ele não é uma aplicação independente, já que suas funções estão integradas com o uso de três outros programas: *Phred*, *Phrap* e *Consed*.

Sucintamente, o *Polyphred* analisa diretamente os sinais expressos no sequenciamento do material genético e detecta SNPs a partir da variação dos sinais de fluorescência dos cromatogramas, enquanto o *Polybayes* considera a cobertura, o número de *reads* (que são as leituras dos sequenciadores que geram os cromatogramas e, posteriormente, as sequências iniciais para processamento das sequências em geral) que foram agrupados no alinhamento e, ainda, a taxa a priori de pontos polimórficos (ARBEX, 2009).

O *fuzzyMorphic* é uma ferramenta para implementação de Sistemas de Inferência Difusa (SIDs), implementado em linguagem *Perl*, que infere conhecimento a partir de um simples arquivo texto com diretivas de descrição dos dados de entrada e dos elementos do modelo do sistema (ARBEX, 2009). Essa ferramenta pode ser utilizada na modelagem e desenvolvimento de SIDs, para os quais é possível, quanto à fuzzificação, representar as funções de pertinência sobre formatos de conjuntos padrão; quanto à máquina de inferência, utilizar os modelos de Mamdani ou de Larsen e quanto à defuzzificação, representar a função de saída sobre formatos de conjuntos padrão e utilizar o centro dos máximos como método de defuzzificação (ARBEX, 2010).

Os métodos de processamento de informação computadorizados são essenciais para a realização de pesquisas biomédicas. O *National Center for Biotechnology Information*, centro de informação biotecnológica da instituição *National Institutes of Health* (NIH) foi fundado no dia 4 de novembro de 1988. Possibilita experiência na criação e manutenção de bases de dados biomédicas, servindo como um programa de pesquisa em biologia molecular computacional (OUR MISSION, 2012).

O NCBI tem o objetivo de desenvolver novas tecnologias de informação para o auxílio e entendimento dos processos moleculares e genéticos que estão ligados a controle de saúde e de doenças. Coordena esforços para coletar informação de biotecnologia, além de criar e manter sistemas automatizados para armazenar e analisar conhecimento sobre biologia molecular, bioquímica e genética, assim facilitando o uso de bases de dados e software para pesquisa a comunidade científica (OUR MISSION, 2012).

Dentre as principais ferramentas que o NCBI possui, destacamos no presente artigo o *Entrez* e o *Blast* (*Basic Local Alignment Search Tool*). O *Entrez* é o sistema de busca e recuperação do NCBI que oferece aos usuários acesso integrado a sequenciamento, mapeamento, taxonomia e dados estruturais, além de fornecer visualizações gráficas de sequências e mapas de cromossomos (ENTREZ HELP, 2012). O *Blast* é um programa para busca de similaridade entre sequências, importante para a identificação de genes e características genéticas (TISDALL, 2003).

## Resultados e Discussão

NBCI possui diversas ferramentas de auxílio na busca de sequenciamento e comparação. Existem tantas maneiras de encontrar informação utilizando estas ferramentas que para quem inicia esses estudos geralmente têm dificuldade na hora de escolher a ferramenta certa para realização de buscas na base de dados.

Com as ferramentas e métodos descritas no tópico 2, foi possível realizar buscas na base de dados do NCBI. A aplicação desenvolvida lê dois arquivos, onde o primeiro são dados da sequência genética de diversos animais, e o segundo é uma avaliação destas sequências. A partir das informações dos arquivos lidos, ocorre filtragem de dados, onde a aplicação gera um novo arquivo com dados relevantes para o estudo. Este é usado para recuperação dos dados encontrados num determinado banco do NCBI. Se identificado, é gerado um arquivo com várias identidades de sequenciamento, cada um contendo um valor de precisão do possível SNP. A identidade com maior valor de precisão será buscado por meio da ferramenta *eUtilities* e verificar se é um SNP ou não, assim validando as pesquisas feitas através da aplicação.

## Conclusões

Ao fazer uma pesquisa sempre optamos por maneiras mais simples de compreender o que procuramos. Na bioinformática não é diferente e como existe um mundo vasto de informação complicamos-nos com o excesso e a falta de organização e armazenamento.

O NCBI oferece diversas ferramentas de pesquisa auxiliando estudo de bioinformática, porém falta aos estudiosos desta área uma abordagem padrão, e a aplicação apresentada nos possibilita uma forma eficiente e simples de pesquisarmos dados relevantes para análise e interpretação.

## Agradecimentos

Os autores agradecem à Embrapa Gado de Leite, onde esse trabalho foi desenvolvido, e à Fapemig pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica e Tecnológica.

## Literatura Citada

ARAÚJO, K. R. et. al. **O Papel dos Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs) Pvu II e Xba I e das Pequenas Repetições em Tandem (STRs) (TA)<sub>n</sub> e (GT)<sub>n</sub> do Receptor de Estrogênio Alfa (ESR1) na Suscetibilidade do Câncer de Mama (BRCA).** Revista Brasileira de Cancerologia. 2009. Disponível em [http://www.inca.gov.br/rbc/n\\_55/v02/pdf/13\\_revisao\\_literatura4.pdf](http://www.inca.gov.br/rbc/n_55/v02/pdf/13_revisao_literatura4.pdf). Acesso em 03/12/2012 às 23:52 horas.

ARBEX, WAGNER ANTONIO. **Modelos computacionais para identificação de informação genômica associada à resistência ao carrapato bovino.** Tese de doutorado. 2009.

ARBEX, WAGNER; CARVALHO, LUIZ ALFREDO VIDAL DE; SILVA, MARCOS VINÍCIUS BARBOSA DA. **Mineração de dados em sequências de cDNA.** 2010.

ENTREZ HELP. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK3837/pdf/EntrezHelp.pdf>. Acesso em 12/12/2012 às 22:00 horas.

LEHNINGER. A., NELSON, D. L., COX. M. M. **Principles of Biochemistry** - 5nd ed. W H. Freeman and Company. 2008.

MADDEN, T. **BLAST Help Manual Overview.** Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK52636/>. Acesso em 12/12/2012 às 22:25 horas.

OUR MISSION. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/glance/ourmission.html>. Acesso em: 12/12/2012 21:45 horas.

WEAVER, R. F. **Molecular Biology – 5nd ed.** McGraw-Hill. 2012.

SMITH, K. **Genetic Polymorphism and SNPs - Genotyping, Haplotype Assembly Problem, Haplotype Map, Functional Genomics and Proteomics.** McGill School of Computer Science. 2002. Disponível em: [http://www.cs.mcgill.ca/~kaleigh/compbio/snp/snp\\_summary.pdf](http://www.cs.mcgill.ca/~kaleigh/compbio/snp/snp_summary.pdf). Acesso em 03/12/2012 às 20:19 horas.

TISDALL, J. D. **Mastering Perl for Bioinformatics.** O'Reilly. 2003.



# Percepção ambiental dos produtores de leite localizados em municípios da Zona da Mata Mineira<sup>1</sup>

Cristina Silva de Oliveira<sup>2</sup>, Heloisa Carneiro<sup>3</sup>, Amanda Nascimento de Faria<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Financiada pelas instituições: Embrapa Gado de Leite, Fapemig e CNPq.

<sup>2</sup> Estagiária, Bolsista Fapemig, Juiz de Fora, MG. e-mail: chrisoliveira.jf@gmail.com

<sup>3</sup> Pesquisadora da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. E-mail: heloisa.carneiro@embrapa.br

<sup>4</sup> Estagiária, Bolsista CNPQ, Juiz de Fora, MG. e-mail: mandinha\_nfaria@hotmail.com

**Resumo:** O objetivo da pesquisa é compreender como os produtores e familiares percebem a produção animal influenciando o meio ambiente, as reservas florestais e cursos d'água em sua propriedade e analisar os vários relatos de experiência destes sobre a temática ambiental. Para tanto, foi utilizada a pesquisa qualitativa associada a técnicas para coleta de dados como: observação; entrevista; análise cartográfica da área; pesquisa documental e bibliográfica. Os resultados apontam para a diversidade de interpretações e relações estabelecidas entre os pequenos, médios e grandes produtores de leite com o meio ambiente, bem como para a diversidade de impactos decorrentes dessa relação que ora se revela harmoniosa e ora conflituosa, com a impressão e alteração das paisagens rurais.

**Palavras-chave:** pesquisa qualitativa; produtores rurais; meio ambiente.

**Abstract:** The purpose of this research is to discuss the various reports of the experience of small, medium and large milk producers in the Zona da Mata Mineira on environmental issues. Thus, we used qualitative research techniques associated with data collection such as observation, interview, cartographic analysis of the area, desk research and literature. The results point to the diversity of interpretations and relationships established between small, medium and large dairy farmers with the environment as well as the diversity of impacts resulting from this relationship that unfolds smoothly hours and hours conflicted with imprint and change rural landscapes.

**Keywords:** environmental issues; qualitative research; rural producers.

## Introdução

Analisar o conjunto de relações socioambientais estabelecidas entre os produtores de leite de alguns municípios da Zona da Mata Mineira é um desafio em face do emaranhado de formulações que tem sido construída no decorrer do tempo e espaço. Com a popularização da questão ambiental e com o aumento crescente das discussões, a sociedade mudou a forma como vê a agropecuária. As críticas ao setor começaram a obter status mais severo do ponto de vista ecológico, a partir do avanço da modernização, dado que seus impactos ficaram mais evidentes. O incremento de danos como a erosão dos solos e a contaminação provocada pelos pesticidas nas águas, ar e solo, adquiriu, nas décadas de 70 e 80, grande visibilidade política, criando as condições para o surgimento e desenvolvimento de um movimento pela agricultura sustentável (UZÊDA, 2004).

Por outro lado, resultados econômicos de algumas propriedades leiteiras que adotam técnicas alternativas, comprovam que investimentos realizados para a correção da acidez do solo, inseminação artificial, e maiores cuidados com a qualidade do leite no momento da ordenha contribuiriam para melhores resultados, já que impactariam diretamente na produtividade, determinante para a rentabilidade da atividade e para sustentação do sistema.

É partindo dessa premissa, que o presente trabalho almeja compreender como os produtores e familiares percebem a produção animal influenciando o meio ambiente, as

reservas florestais e cursos d'água em sua propriedade e analisar os vários relatos de experiência destes sobre a temática ambiental.

## Material e Métodos

Para o desenvolvimento do presente estudo foi feita uma pesquisa de cunho qualitativa associada a técnicas para coleta de dados tais como: observação participante; entrevista; análise cartográfica da área, além de uma apreciação bibliográfica onde se delineou o referencial teórico que daria suporte para compreensão das questões pertinentes ao estudo.

A pesquisa foi realizada em 28 propriedades leiteiras, sendo que todas as propriedades estão situadas em municípios localizados na Zona da Mata Mineira. O universo da pesquisa é constituído de pequenos, médios e grandes produtores que possuem suas propriedades localizadas nos municípios de Aracitaba, Juiz de Fora, Belmiro Braga, Matias Barbosa, Goianá, Rio Novo, Pequeri, Santa Bárbara do Monte Verde, Rio Preto, Rio Pomba, Piau, Coronel Pacheco, Guarani e Muriaé, Silveira Carvalho, Barão do Monte Alto. Todos os municípios supracitados estão localizados na Zona da Mata Mineira, conforme o mapa da Figura 1.

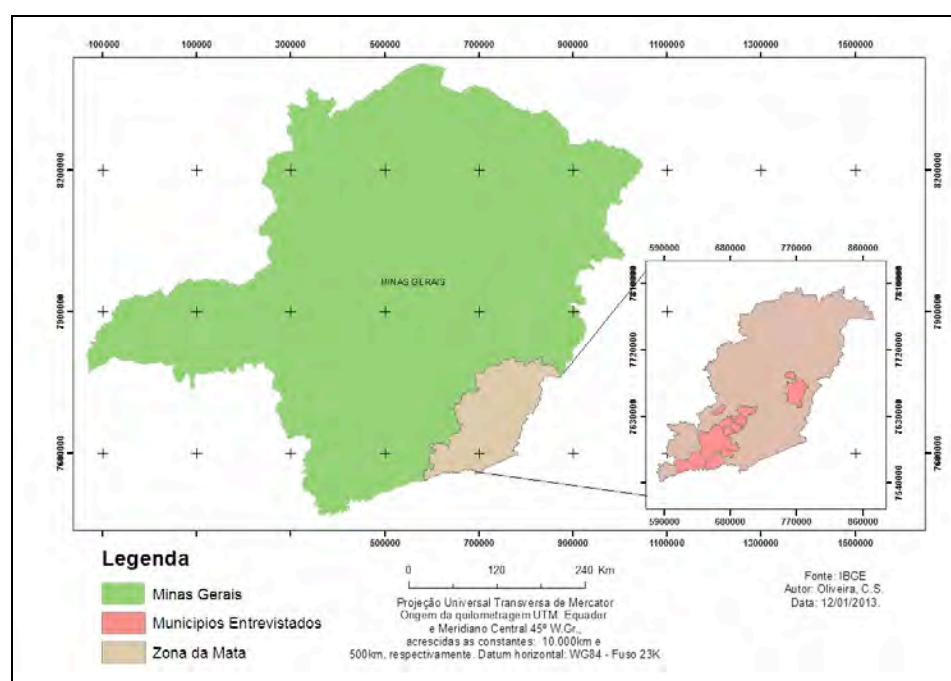


Figura 1. Mapa de Localização dos municípios visitados.

O período em que foi realizado o estudo foi de julho a dezembro de 2012. As informações das propriedades leiteiras foram obtidas junto aos produtores, utilizando-se para tal algumas técnicas de observação participante, entrevista livre com aplicação de questionário semiestruturado, caminhada e coleta de coordenadas geográficas para a elaboração de um mapa constando as propriedades visitadas.

## Resultados e Discussão

O pequeno produtor rural, que praticamente produz para sua subsistência, sem muitas orientações, reproduz os métodos aprendidos com seus pais, que por sinal aprenderam com seus avós e aí por diante. Estes produtores rurais são criadores de gado leiteiro, possuem manejo com ordenha manual em sua maioria e mecânica em menor proporção. O leite retirado é vendido *in natura* ou utilizado na confecção de queijo, que é feito na própria propriedade. Eles relataram que possuem reservas florestais em sua propriedade, e que esta está diretamente relacionada com o fluxo constante das águas

dos córregos. Relataram ainda, que suas nascentes estão isentas das interferências humanas e animais, já que se localizam nas grotas e matas fechadas, mas cujos animais têm acesso aos córregos.

Em contraposição, os médios e grandes produtores que em muitos casos não residem na propriedade, fazem com que a propriedade rural assuma um aspecto exclusivamente econômico, dado pelo melhoramento genético do gado, da mecanização e otimização do espaço de produção e consequentemente da produtividade. Esse tipo de relação puramente economicista trás o distanciamento físico do produtor da propriedade, ao mesmo tempo em que potencializa a visão mercantilista da natureza e seus recursos.

Com relação às questões ambientais, em algumas propriedades de grandes produtores de leite, foram encontrados cenários deflagradores do descaso com os solos, com a vegetação e com os recursos hídricos. Na Fazenda São Francisco, por exemplo, boa parte da propriedade se encontra em área de preservação permanente, com intervenções antrópicas de variados tipos e ordens.

O produtor Sebastião destaca: *“Esse negócio de reserva legal tá trazendo uma insegurança pra gente... a minha propriedade é toda APP. Esse código tá muito confuso, a gente não tá entendendo isso direito.”*

Foi explicitado pelo produtor que sua propriedade não possui uma área agrícola suficiente para a sua sustentação econômica, obrigando-o a utilizar as áreas restritivas por lei para uso econômico, cenário recorrente em muitas propriedades rurais do Estado de Minas Gerais. Em outras propriedades rurais, entretanto, de pequenos, médios e grandes produtores a realidade é oposta a descrita, com a presença de fragmentos florestais conservados na forma de reserva legal e em áreas de preservação permanente, e com a utilização de uma agropecuária alternativa. A presente constatação revela que diversas justificativas culturais, econômicas, sociais e ambientais contribuem para que o uso da terra, bem como a forma como o produtor se relaciona com ela se revista de um emaranhado de relações e de diferentes contextos, não permitindo uma análise simplificada da mesma, ou até mesmo, uma simples categorização dos usos e formas em tabelas.

A consciência ambiental parece está presente em muitas propriedades visitadas, entretanto muitas vezes os produtores se vêm sem alternativas técnicas e localizacionais para o estabelecimento de suas atividades econômicas. Claramente o elucidado evidencia a latente necessidade da proposição de soluções aos problemas socioambientais enfrentados pelos produtores rurais na Zona da Mata Mineira.

## Conclusões

Os vários relatos obtidos junto aos produtores rurais permitiram identificar a diversidade de interpretações a cerca da temática socioambiental, bem como, as configurações espaciais expressas nas paisagens a ela associadas. Essas contribuições mostraram-se importantes, ao realçarem as principais características e vivências desse contingente populacional que ainda reside na zona rural, bem como suas práticas e saberes.

Constatou-se que a atividade agropecuária abrange um universo diverso e complexo, constituído de produtores rurais das mais diversas origens e tipologias.

De acordo com os relatos obtidos juntos aos produtores rurais da Zona da Mata, muitos são os problemas vivenciados no meio rural. Dentre eles a desvalorização do leite no mercado e a falta de mão de obra, o elevado preço dos insumos agrícolas e as importações de leite de países vizinhos. Concomitantemente a tudo isso, a exigibilidade legal quanto a aspectos ambientais e de qualidade do leite dificultam o desenvolvimento das atividades do produtor de leite.

Fica então explícito, que a utilização da Educação Ambiental pode proporcionar o maior entendimento dos impactos ocasionados pela agropecuária, e que a maior capacitação e maior disponibilidade de extensionistas que auxiliem em especial os pequenos produtores a procurar novas formas de manejo, que evitem a erosão e o uso inadequado de agrotóxicos, podem aumentar conjuntamente a produtividade e bem-estar.

## **Agradecimentos**

A Embrapa Gado de Leite, ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), Fapemig (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais), e principalmente aos produtores rurais pelo auxílio e pela colaboração com o projeto de pesquisa. Ao técnico da ABCGIL, José Geraldo, pela companhia nos trabalhos de campo e a Emater de Juiz de Fora pela ajuda na aproximação aos produtores de leite de Juiz de Fora.

## **Literatura Citada**

UZÊDA, M.C. **O desafio da agricultura sustentável: alternativas viáveis para o sul da Bahia**. Editus. Ilheus. 130p.

# Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite



## XII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

### Trabalhos:

#### **1. Óxido de cromo e dióxido de titânio na estimativa da produção de fecal de vacas em lactação manejadas em pastejo**

Autores: Óxido de cromo e dióxido de titânio na estimativa da produção de fecal de vacas em lactação manejadas em pastejo

#### **2. Características do pasto e desempenho de novilhas em sistema silvipastoril ou monocultivo**

Autores: Clóvis Alencar Freitas Faria, Priscila Beligoli Fernandes, Vinícius Sacramento Pacheco, Henrique Louro Ad'vincula, Mirton José Frota Morenz, Domingos Sávio Campos Paciullo

#### **3. Massa de forragem e composição morfológica em capim-Marandu manejado sob pastejo durante o período seco**

Autores: Vinícius Sacramento Pacheco, Carlos Augusto de Miranda Gomide, Bárbara Cardoso da Mata e Silva, Domingos Sávio Campos Paciullo, Fernando César Ferraz Lopes, Mirton José da Frota Morenz

#### **4. Desenvolvimento de metodologias para a identificação de patógenos em leite e produtos lácteos por meio de PCR em tempo real**

Autores: Vieira, FO; Fonseca, I; Pinto, ISB; Santos, ASO; Martins, SAV; Fogaça, GN; Lima, KR; Martins, MF

#### **5. Identificação e caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina**

Autores: Carla Christine Lange, Maria Aparecida V. P. Brito, Marco Antônio Machado, Daniele Ribeiro de L. Reis, Igor Rosa Meurer, Rafaela Soares de Mendonça, Bianca Larcher Oliveira

#### **6. Avaliação do leite desnatado e dos crioprotetores sacarose e sódio glutamato para preservação de bactérias liofilizadas**

Autores: Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito, Janaína Miranda Barros, Bianca Larcher Oliveira, Rafaela Soares de Mendonça, João Batista Ribeiro, Marcos Aurélio Souto Silva, Carla C. Lange.

#### **7. Produção de manteigas naturalmente enriquecidas com CLA cis-9 trans-11 como fonte de matéria prima para formulações cosméticas nanoestruturadas**

Autores: Mariana Macedo de Almeida, Humberto de Mello Brandão, Marco Antônio Sundfeld da Gama, Carlos Gustavo Santos Ribeiro, Bárbara Cardoso da Mata e Silva, Mirton José Frota Morenz, Carolina Banni Alevato, Fernando César Ferraz Lopes

**8. *Tithonia diversifolia* [Hemsl.] Gray associada à *Brachiaria brizantha*: composição bromatológica, cinética de fermentação ruminal e produção de metano *in vitro***

Autores: Person Luiz de Paula Silva, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, Leonardo Henrique Ferreira Calsavara, Sylvia Rocha e Silveira, Rafael Sandin Ribeiro, Dayana Carvalho, Danielle Storino de Freitas, João Paulo Sacramento, Thierry Ribeiro Tomich, Rogério Martins Maurício

**9. Variabilidade genética de clones de *Brachiaria ruziziensis* para a resistência à *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera:Cercopidae)**

Autores: Alexander Machado Auad, Tiago Teixeira Resende, Natália de Andrade Teixeira Fernandes, Fausto Souza Sobrinho, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

**10. Polimorfismos genéticos nos genes da beta-lactoglobulina e kappa-caseína em bovinos selecionados para produção de leite**

Autores: Lorena Evangelista Fernandes, Sabine Wohlres Viana, Daniele Ribeiro de Lima Reis, Rui da Silva Verneque, Marco Antonio Machado

**11. Evolução da raça Sindí no Brasil e sua diversidade genética**

Autores: Letícia Mendonça Pinto, Taísa Nascimento de Souza, Rui da Silva Verneque, João Cláudio do Carmo Panetto

**12. Efeitos das variáveis touros e estações do ano sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos**

Autores: Michele Cristiny Lempk Bolpato, João Gabriel Viana Grázia, Fernanda da Silva Gonçalves, Thamiris Dornelas Araújo, Carolina Capobianco R. Quintão, Lilian Tamy Iguma, Luiz Sérgio de Almeida Camargo

**13. Efeito do FSH recombinante humano durante a maturação *in vitro* na competência oocitária em bovinos**

Fernanda Bernardes Eugênio de Paula, Eliza Diniz de Souza, Thamiris Dornelas de Araújo, Carolina Capobianco Romano Quintão, Lilian Tamy Iguma, Bruno Campos de Carvalho, João Henrique Moreira Viana, Luiz Sergio de Almeida Camargo

**14. Produção de embriões transgênicos por meio de microinjeção de vetores lentivirais em zigotos bovinos**

Autores: Monique G. da Anunciação, Thamiris D. de Araújo, Eliza D. de Souza, Fernanda B.E. de Paula, Fernanda Gonçalves, Carolina C. R. Quintão, João Henrique M. Viana, Lilian T. Iguma, Luiz Sérgio A. Camargo

**15. Conteúdo de DNA de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa**

Autores: Tadiana Luiza Fernandes, Carolina de Souza Fonseca, Ana Luisa Sousa Azevedo, Juliane Dornellas Nunes, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Lédo, Antonio Vander Pereira, Fausto de Souza Sobrinho, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites

**16. Viabilidade de pólen em plantas de *Brachiaria ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente**

Autores: Anna Carolina Pereira Staico, Letícia Santos Furtado, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Lédo, Fausto Souza Sobrinho



# Óxido de cromo e dióxido de titânio na estimativa da produção de fecal de vacas em lactação manejadas em pastejo

## Chromium oxide and titanium dioxide to estimate fecal output of grazing lactating cows

Iano Ayupe<sup>1</sup>, Afranio Silva Madeiro<sup>2</sup>, Bárbara Cardoso da Mata e Silva<sup>3</sup>, Vinícius Sacramento Pacheco<sup>1</sup>, Carlos Augusto de Miranda Gomide<sup>4</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>4,\*</sup>, Fernando César Ferraz Lopes<sup>4</sup>, Mirton José Frota Morenz<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduando Ciências Biológicas-CES/JF; Bolsista IC CNPq. E-mail: iano.ayupe@hotmail.com; sacramentopacheco@hotmail.com

<sup>2</sup>Doutorando do Programa de Pós-graduação em Zootecnia-UFRRJ. Bolsista da CAPES. e-mail: afraniomadeiro@hotmail.com

<sup>3</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia-UFMG. Bolsista do CNPq. e-mail: barbaracmsilva@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite. e-mail: carlos.gomide@embrapa.br; domingos.paciullo@embrapa.br; fernando.lopes@embrapa.br; mirton.morenz@embrapa.br

\*Bolsista de Desenvolvimento Tecnológico-CNPq

**Resumo:** Foram avaliados os indicadores óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) e dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) na estimativa da produção fecal de vacas mestiças em lactação manejadas em pastagem de capim-Marandu. O experimento foi conduzido no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite e localizado na Zona da Mata de Minas Gerais. Foram utilizadas 16 vacas Holandês x Zebu em lactação, com peso vivo médio de 490 kg, e produção médias de 17 kg/vaca/dia de leite, mantidas em pastagem de *Brachiaria brizantha* Jacq. cv. Marandu, manejada sob lotação rotacionada. Os indicadores foram fornecidos simultaneamente, administrados via oral, em doses de 5 g, duas vezes ao dia (7h30 e 14h30). Foi empregado o delineamento estatístico em blocos casualizado, com 16 blocos (vacas). Os valores estimados de produção fecal não variaram em função do indicador utilizado ( $P > 0,05$ ). As médias de produção fecal estimadas utilizando-se  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e  $\text{TiO}_2$  foram, respectivamente,  $6,0 \pm 0,6$  e  $5,7 \pm 0,51$  kg/dia de MS. Os resultados obtidos indicam que  $\text{TiO}_2$  pode ser utilizado como alternativa ao  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  na estimativa da produção fecal de bovinos manejados sob condição de pastejo.

**Palavras-chave:** *Brachiaria brizantha*, consumo de matéria seca, métodos indiretos.

**Abstract:** Chromium oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) and titanium dioxide ( $\text{TiO}_2$ ) were evaluated to estimate the fecal output of grazing lactating cows, in marandugrass pasture. The experiment was carried out at the experimental center of Embrapa Dairy Cattle National Research Center, located in the Zona da Mata of Minas Gerais. Were used 16 Holstein x Zebu dairy cows with average body weight of 490 kg, and average milk production of 17 kg/cow/day, on *Brachiaria brizantha* Jacq. cv. Marandu pasture, managed under rotational stocking. The indicators were supplied orally at doses of 5 g twice a day (7.30 to 14.30 h). Was adopted a randomized block experimental design, with 16 blocks (cows). The estimated mean values of fecal output did not vary in function of the indicator ( $P > .05$ ). The average fecal output estimated using  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  and  $\text{TiO}_2$  were, respectively,  $6.0 \pm 0.6$  and  $5.7 \pm 0.51$  kg/day of DM. The results indicate that  $\text{TiO}_2$  can be used as an alternative to  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  to estimate fecal output of grazing cattle.

**Keywords:** *Brachiaria brizantha*, dry matter intake, indirect methods.

## Introdução

No Brasil os sistemas de produção bovinos são baseados na utilização do pasto como principal fonte de nutrientes para os animais. Nestes sistemas é fundamental conhecer quanto dos requerimentos nutricionais dos animais são atendidos pelo pasto,



permitindo o planejamento de estratégias de suplementação, de forma a obter a máxima eficiência econômica e produtiva do sistema.

Neste contexto, a principal metodologia utilizada para a estimativa do consumo de matéria seca é aquela que emprega a relação da produção fecal com a digestibilidade do alimento, onde a produção fecal é estimada por meio de indicadores externos, sendo o óxido de cromo ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) amplamente utilizado como indicador externo. No entanto, este indicador apresenta como principal limitação a presença de propriedades carcinogênicas (MYERS et al., 2006); e o fato de que o *Food and Drug Administration* – FDA (EUA) não aprova este indicador como aditivo dietético.

Como alternativa ao uso do  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ , o dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) tem sido apontado como um substituto viável (TITGEMEYER et al., 2001; MYERS et al., 2006). Este indicador, além de não apresentar propriedades nocivas à saúde (GLINDEMANN et al., 2009) é aprovado como aditivo em alimentos, desde que não exceda 1% do produto final (TITGEMEYER et al., 2001), e apresenta custo menor, quando comparado ao  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  (VALADARES FILHO et al., 2006).

O objetivo neste trabalho foi avaliar os indicadores  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e  $\text{TiO}_2$  na estimativa da produção fecal de vacas mestiças em lactação manejadas em pastagem de capim-Marandu.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite e localizado na Zona da Mata de Minas Gerais. As coordenadas geográficas do local são 21°33' de latitude Sul e 43°16' de longitude Oeste, a 410 metros de altitude.

Foram utilizadas 16 vacas Holandês x Zebu em lactação, com peso vivo médio de 490 kg e produção média de 17 kg/vaca/dia de leite, mantidas em uma área de quatro hectares de pastagem de *Brachiaria brizantha* Jacq. cv. Marandu, manejada sob lotação rotacionada.

Foram estudados os indicadores externo óxido crômico ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ) e dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ). Os indicadores foram fornecidos simultaneamente, administrados via oral, em doses de 5 g, duas vezes ao dia (7h30 e 14h30). O procedimento foi realizado durante 12 dias: nos seis primeiros dias, foram obtidos o equilíbrio da ingestão e a excreção do indicador e, a partir do sexto dia, foram feitas as coletas de fezes.

As amostras de fezes foram coletadas diretamente do reto dos animais, duas vezes ao dia (7h30 e 14h30), e imediatamente congeladas a -18 °C. Ao final do experimento, foram descongeladas, pré-secas em estufa de ventilação forçada ( $55 \pm 5$  °C), durante 72 horas, trituradas em moinho tipo Willey com peneira de 1 mm e analisadas para determinação do teor de MS. Os teores de cromo e titânio nas fezes foram determinados por meio de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

A produção fecal (PF), em kg de MS/dia, foi obtida por meio da seguinte fórmula:  $\text{PF} = \text{cromo administrado (g/dia)} / \text{cromo nas fezes (g/kg de MS)}$  (POND et al., 1989).

Foi empregado o delineamento estatístico em blocos casualizado, com 16 blocos (vacas). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste “F” a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Os valores estimados de produção fecal não variaram em função do indicador utilizado ( $P > 0,05$ ). As médias de produção fecal estimadas utilizando-se  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e  $\text{TiO}_2$  foram, respectivamente,  $6,0 \pm 0,6$  e  $5,7 \pm 0,51$  kg/dia de MS.

Myers et al. (2006) estudaram o padrão de excreção de  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e  $\text{TiO}_2$  em ovinos. Os autores reportaram que o padrão de excreção dos indicadores foram semelhantes, sendo, portanto, o uso do  $\text{TiO}_2$  uma alternativa viável ao  $\text{Cr}_2\text{O}_3$ .

Titgemeyer et al. (2001), avaliando o uso de  $\text{TiO}_2$  na estimativa da produção fecal em novilhas, não relataram diferenças ( $P = 0,15$ ) entre os valores estimados com  $\text{TiO}_2$  e aqueles obtidos por meio de coleta total de fezes, embora tenham observado valores

numericamente maiores para a produção fecal estimada. Estes autores, comparando valores de produção fecal estimados com  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e o  $\text{TiO}_2$ , com aqueles obtidos por meio de coleta total e fezes, relataram que a produção fecal foi subestimada pelo  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  e superestimada pelo  $\text{TiO}_2$ . Estas estimativas podem ser atribuídas às recuperações dos indicadores nas fezes. Dados na literatura demonstram a tendência de o  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  superestimar o consumo (MORENZ et al., 2006).

É importante destacar que, sob condição de pastejo, os valores estimados pelos indicadores podem ser comparados apenas aos outros obtidos utilizando outras metodologias, as quais também apresentam vícios.

## **Conclusões**

O  $\text{TiO}_2$  pode ser utilizado como alternativa ao  $\text{Cr}_2\text{O}_3$  na estima da produção fecal de bovinos manejados sob condição de pastejo.

## **Agradecimentos**

Agradecimentos à Fapemig pelo apoio financeiro, ao CNPq pela concessão das bolsas de Iniciação Científica e de Doutorado e à Capes pela concessão da bolsa de Doutorado.

## **Literatura citada**

GLINDEMANN, T.; TAS, B.M.; WANG, C. et al. Evaluation of titanium dioxide as an inert marker for estimating faecal excretion in grazing sheep. **Anim. Feed Sci. Technol.**, v.152, 186–197, 2009.

MORENZ, M.J.F.; SILVA, J.F.C. da; AROEIRA, L.J.M. et al. Óxido de cromo e n-alcanos na estimativa do consumo de forragem de vacas em lactação, em condições de pastejo. **R. Bras. Zootec.**, v.35, p.1535-1542, 2006.

MYERS, W.D.; LUDDEN, P.A.; NAYIGIHUGU, V. et al. Excretion of titanium dioxide and chromic oxide in duodenal digesta and feces of ewes. **Small Rumin. Res.**, v.63, 135–214, 2006.

POND, K.R.; LUGINBUHL, J.M.; BURNS, J.C. et al. Estimating intake using rare earth markers and controlled release devices. In: SOUTHERN PASTURE AND FORAGE CROP IMPROVEMENT CONFERENCE, 45., 1989, Little Rock, Arkansas. **Proceedings...** Little Rock: USDA/ARS, 1989b. p.73-81.

TITGEMEYER, E.C.; ARMENDARIZ, C.K.; BINDEL, D.J. et al. Evaluation of titanium dioxide as a digestibility marker for cattle. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.1059-1063, 2001.

# Características do pasto e desempenho de novilhas em sistema silvipastoril ou monocultivo<sup>1</sup>

## Pasture traits and performance of heifers in silvopastoral system or monoculture

Clóvis Alencar Freitas Faria<sup>2</sup>, Priscila Beligoli Fernandes<sup>3</sup>, Vinícius Sacramento Pacheco<sup>2</sup>, Henrique Louro Ad'vincula<sup>2</sup>, Mirton José Frota Morenz<sup>4</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado da segunda autora

<sup>2</sup>Acadêmico do curso de Ciências Biológicas – CES/JF e-mail: cacadefreitas@hotmail.com

<sup>3</sup>Estudante de doutorado - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ

<sup>4</sup>Pesquisador – Embrapa Gado de Leite e-mail: domingos.paciullo@embrapa.br

**Resumo:** O trabalho teve como objetivo avaliar a composição morfológica, o acúmulo de forragem e o ganho de peso de novilhas leiteiras em pastagens de *B. decumbens* em monocultivo ou sistema silvipastoril, submetida ao pastejo de lotação contínua, durante o verão e outono. Foi usado delineamento de blocos completos casualizados, com dois tratamentos e três repetições. O experimento foi realizado no período de dezembro de 2012 a junho de 2013. O acúmulo de forragem e o ganho de peso das novilhas não variaram com o tipo de sistema e com a estação do ano. As massas de folhas, colmos e material morto, assim como a capacidade de suporte foram maiores no monocultivo que no sistema silvipastoril. Os resultados indicam que o sombreamento de 42% no sistema silvipastoril influenciou negativamente o desempenho do sistema.

**Palavras-chave:** massa de folhas, massa de forragem, pastejo, sombreamento.

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the morphological composition, herbage accumulation and body weight gain of dairy heifers in *B. decumbens* pastures in monoculture and silvopastoral system, under continuous stocking during the summer and autumn. The randomized block design with two treatments and three replications was used. The experiment was performed from December 2012 to June 2013. The herbage accumulation and body weight gain did not vary with system. The leaf, stem and dead mass and carrying capacity were higher in the monoculture than in the silvopastoral system. The results indicate that the shading of 42% in silvopastoral system had negative influence on performance of system.

**Keywords:** forage mass, grazing, leaf mass, shading.

## Introdução

O avanço do processo de degradação das pastagens comporta uma redução progressiva da produtividade e do valor nutritivo das forrageiras e, consequentemente, da produção animal, o que tem constituído em uma das principais limitações à sustentabilidade dos sistemas de produção de bovinos baseados em pastagens. O uso de sistemas silvipastoris para recuperação e desenvolvimento de pastagens em regiões de pecuária de leite se torna eficiente, tendo em vista alguns benefícios como conservação do solo e da água, melhoria da fertilidade do solo e o conforto térmico para os animais. Porém, as árvores reduzem a luminosidade disponível para as pastagens que crescem sob suas copas, condição que pode afetar sua produtividade (CARVALHO, 2001). A literatura indica que, para gramíneas do gênero *Brachiaria*, as produções de forragem sob sombreamento moderado (redução de 25 a 30% da radiação fotossinteticamente ativa) têm sido semelhantes ou até maiores do que a pleno sol (PACIULLO et al., 2007). Embora ainda escassos, os estudos indicam o potencial de sistemas silvipastoris para aumentar o ganho de peso de novilhas leiteiras quando comparado aos resultados em pastagens em monocultivo (PACIULLO et al., 2011).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a composição morfológica, o acúmulo de massa seca de forragem e o ganho de peso de novilhas leiteiras em pastagens de *Brachiaria decumbens* em sistema silvipastoril e monocultivo, submetidas ao regime de lotação contínua.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Bruschi, pertencente à Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco/MG, em um sistema silvipastoril instalado em área de topografia montanhosa, com declividade de aproximadamente 30%, durante o período de dezembro de 2012 a junho de 2013. O solo da área é classificado como Latossolo Vermelho-Amarelo, distrófico. A precipitação média mensal é de 60 mm e temperatura média de 17 °C, de abril a setembro, e de 230 mm e 24 °C, de outubro a março. O delineamento experimental adotado foi de blocos completos casualizados, com dois tratamentos e três repetições. Nas parcelas foram alocados os tratamentos que consistiram do tipo de sistema avaliado (monocultivo ou silvipastoril), com área de cada parcela de 1,5 ha. Os piquetes foram manejados segundo o método de lotação contínua. Cada piquete foi pastejado por três novilhas Holandês x Zebu (animais de prova), de peso vivo inicial médio de 200 kg, perfazendo um total de 18 animais de prova. Animais reguladores foram colocados e retirados de cada piquete, a fim de se manter a altura média do pasto de 30 cm. A massa de forragem foi estimada com base em cortes realizados em todos os piquetes, com uma frequência de 21 dias. Para isso, 10 amostras foram coletadas, em cada piquete, com auxílio de moldura metálica de 0,5 x 0,5 m, nos pontos médios da altura. Nos piquetes arborizados foram coletadas três amostras na faixa de árvores e sete na faixa sem árvores, a fim de se obter representatividade adequada da condição média do pasto. As plantas foram cortadas a altura de 5 cm do solo, sendo em seguida levadas ao laboratório para pesagem. Duas amostras foram obtidas, sendo uma para determinação do teor de matéria seca da massa total de forragem e a outra para separação das frações verde e morta. Da fração verde foram separadas as folhas e colmos. Os materiais foram, então, secos em estufa de ventilação forçada a 55 °C, por 72 horas, para determinação da matéria seca. Para o acúmulo de forragem foram utilizadas três gaiolas de exclusão (0,49 m<sup>2</sup>) por piquete. Nos piquetes arborizados uma gaiola foi alocada sob a copa das árvores, a fim de estimar o acúmulo sob a influência do sombreamento. A escolha do ponto de exclusão foi tomada com base na altura média do pasto. No dia zero (fixação das gaiolas), para cada gaiola fixada, foram escolhidos dois pontos semelhantes quanto às condições de altura do pasto e cobertura do solo. Um ponto foi alocado sob a gaiola e o outro foi usado para estimativa da massa de forragem no dia zero. Decorridos 21 dias, a massa de forragem acumulada no interior da gaiola foi cortada, em área de 0,5 x 0,5 m. Transcorridos sete dias desta avaliação, as gaiolas foram realocadas e um novo ciclo de 21 dias teve início, seguido de outro período de sete dias sem gaiolas, e assim sucessivamente até o final do período avaliado. O acúmulo de forragem foi estimado pelo método agrônomo da diferença, conforme a equação:  $AF = MF_f - MF_i$ , sendo: AF = acúmulo de forragem;  $MF_f$  = massa de forragem, sob a gaiola, no último dia de exclusão (21º dia);  $MF_i$  = massa de forragem na colocação das gaiolas (1º dia). As taxas de acúmulo de forragem foram calculadas pela divisão dos valores de acúmulo de forragem pelo número de dias de exclusão do pasto. As novilhas foram pesadas a cada 30 dias, a fim de se determinar o ganho de peso individual. As análises de variância foram realizadas por meio do procedimento MIXED do pacote estatístico SAS® (*Statistical Analysis System*), versão 9.0 para *Windows*, específico para casos de medidas repetidas no tempo e em que o tempo é um fator a ser estudado como causa de variação. A escolha de matriz de variância e de covariância foi feita utilizando-se o Critério de Informação de Akaike e a análise de variância feita com base nas seguintes causas de variação: tipo de sistema, estações do ano e as interações entre elas. O tipo de sistema adotado, estações do ano e suas interações foram considerados como fixos e, como efeitos aleatórios, foram considerados o erro experimental entre unidades e o erro para a mesma unidade no tempo. As médias dos tratamentos foram estimadas utilizando-se o "LSMEANS" e a comparação entre elas, quando necessária, realizada por meio da

probabilidade da diferença ("PDIFF") usando o teste "t" de "Student" e nível de probabilidade de 5%.

## Resultados e Discussão

O acúmulo de forragem não variou com o sistema, apresentando valor médio de 1.405 kg/ha. As massas secas de folha, colmo e material morto foram maiores no monocultivo que no sistema silvipastoril (Tabela 1). Como reflexo das maiores massas de folhas, a taxa de lotação também foi maior no monocultivo que no sistema silvipastoril (Tabela 1). Apesar disso, não foi observada diferença significativa no ganho de peso das novilhas entre os dois sistemas de recria. Embora as massas secas do monocultivo tenham sido significativamente maiores, a proporção folha/colmo foi mais favorável no sistema silvipastoril que no monocultivo. As relações folha/colmo foram de 0,8 e 0,6 para o silvipastoril e o monocultivo, respectivamente. A diferença de 25% a favor do pasto arborizado pode ter favorecido o consumo de forragem pelos animais e, possivelmente, neutralizado parcialmente a menor massa de forragem neste sistema. A *B. decumbens* é tolerante ao sombreamento, desde que este esteja entre 30 e 35% da radiação plena. Neste estudo, o sombreamento do sistema silvipastoril esteve entre 40 e 45%, ou seja, acima do valor considerado crítico, no qual o pasto diminui sua produção de forragem (GUENNI et al., 2008; PACIULLO et al., 2007). De fato, os valores de massa seca nos dois sistemas demonstram que houve limitação à manutenção de elevados valores de massa sob o sombreamento. Por outro lado, é interessante observar que os valores de acúmulo de forragem não variaram estatisticamente com o sistema, embora em termos absolutos tenha ocorrido diferença de 20% nos valores em favor do monocultivo.

A semelhança no ganho de peso dos animais indica que o valor nutricional da forragem no pasto não variou. Resultados disponíveis na literatura indicam aumentos nos teores proteicos da forragem submetida ao sombreamento (PACIULLO et al., 2007). Neste estudo, foi realizada adubação da pastagem, o que pode ter reduzido ou mesmo eliminado as diferenças nutricionais do pasto, sob sol pleno e sombreamento. Do ponto de vista zootécnico, dois aspectos devem ser considerados: primeiro a maior massa de folha no monocultivo pode ter contribuído para aumentar a oportunidade de seleção das novilhas em pastejo e conseqüentemente melhorar o valor nutritivo da dieta. Segundo, a reposição de nitrogênio por meio da adubação provavelmente diminui ou eliminou a vantagem nutricional, especialmente em termos de proteína bruta da forragem, do sistema silvipastoril. Neste caso, podem ser esperados desempenhos das novilhas semelhantes nos dois sistemas de recria.

**Tabela 1.** Massa seca de folhas, colmos e material morto (kg/ha), taxa de lotação (UA/ha) e ganho de peso de novilhas leiteiras (g/animal/dia), em sistema silvipastoril e monocultivo de *B. decumbens*.

Sistema de recria	Estação do ano	
	Verão	Outono
	Massa de folhas	
SSP	795bA	663bB
MONO	1.183aA	1.205aA
	Massa de colmos	
SSP	1120bA	928bA
MONO	2.000aA	1.783aB
	Material morto	
SSP	420bA	326bA
MONO	638aA	735aA
	Taxa de lotação	
SSP	1,67bA	1,21aB
MONO	1,82aA	1,32aB
	Ganho de peso <sup>n.s.</sup>	
SSP	534	518

MONO	522	548
------	-----	-----

Médias seguidas de letras diferentes, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, diferem entre si ( $P < 0,05$ ).  
n.s. = não significativo.

### Conclusões

A massa seca dos componentes morfológicos do pasto e a taxa de lotação foram maiores no monocultivo de *B. decumbens*, quando comparado ao sistema silvipastoril, em virtude da redução acentuada da radiação incidente no pasto arborizado. Contudo, o ganho de peso individual das novilhas leiteiras não diferiu entre os sistemas de recria. Devem-se priorizar sombreamentos apenas moderados, a fim de se evitar limitação da quantidade de massa de forragem no pasto em sistema silvipastoril.

### Agradecimentos

Ao CNPq pela bolsa concedida e à Fapemig pelo apoio financeiro.

### Literatura Citada

CARVALHO, M. M. Contribuição dos sistemas silvipastoris para a sustentabilidade da atividade leiteira. In: Simpósio sobre sustentabilidade de sistemas de produção de leite a pasto e em confinamento. Juiz de Fora, 2001. **Anais...** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 85-108.

GUENNI, O.; SEITER, S.; FIGUEROA, R. Growth responses of three *Brachiaria* species to light intensity and nitrogen supply. **Tropical Grasslands**, v.42, p.75-87, 2008.

PACIULLO, D.S.C.; CARVALHO, C.A.B.; AROEIRA, L.J.M. et al. Morfofisiologia e valor nutritivo do capim-braquiária sob sombreamento natural e a sol pleno. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.42, p.573-579, 2007.

PACIULLO D.S.C., CASTRO, C.R.T., GOMIDE, C.A.M., MAURÍCIO, R.M.; PIRES, M.F.A.; MÜLLER, M.D.; XAVIER, D.F. Performance of dairy heifers in a silvopastoral system. **Livestock Science**, v.141, p.:166-172, 2011.

# **Massa de forragem e composição morfológica em capim-Marandu manejado sob pastejo durante o período seco<sup>1</sup>**

## **Forage mass and morphological composition of marandugrass pasture under grazing during the dry season**

Vinícius Sacramento Pacheco<sup>2</sup>, Carlos Augusto de Miranda Gomide<sup>3</sup>, Bárbara Cardoso da Mata e Silva<sup>4</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>3</sup>, Fernando César Ferraz Lopes<sup>3</sup>, Mirton José da Frota Morenz<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado do terceiro autor

<sup>2</sup>Bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Gado de Leite. email: sacramentopacheco@hotmail.com

<sup>3</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. e-mail: carlos.gomide@embrapa.br; domingos.paciullo@embrapa.br; fernando.lopes@embrapa.br; mirton.morenz@embrapa.br

<sup>4</sup>Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia – UFGM. email: barbaracmsilva@yahoo.com.br

**Resumo:** O estudo objetivou avaliar o efeito residual de dois tratamentos impostos na época chuvosa sobre as características de uma pastagem de *Brachiaria brizantha* na época seca subsequente. Os tratamentos foram: manejo com período descanso do piquete determinado pela interceptação da radiação fotossinteticamente ativa de 95% e manejo com período de descanso fixo de 30 dias. O delineamento experimental foi o de blocos ao acaso com duas repetições de área e três repetições dentro do bloco. As variáveis analisadas ao longo dos ciclos de pastejo da estação seca foram: altura em pré-pastejo, massa seca total (MST), percentuais de lâmina foliar, colmos e material morto e relação folha:colmo. Os pastos de capim-Marandu manejados pelo critério de interceptação luminosa apresentaram maior altura, menor MST, maior percentual de folhas e menor percentual de material morto e, por consequência, maior relação folha/colmo. Não houve diferença significativa entre os tratamentos para o número de perfilhos e percentual de colmos. Concluiu-se que o manejo do pastejo conforme a interceptação luminosa, aplicado durante a época chuvosa, interfere positivamente nas características estruturais do pasto durante o período seco.

**Palavras-chave:** altura do dossel, *Brachiaria brizantha*, pastejo rotacionado, vacas em lactação.

**Abstract:** The study aimed to evaluate the effect of two pasture management applied in the rainy season on the characteristics of a marandugrass in the subsequent dry season. The managements were: paddock rest period determined by the interception of photosynthetically active radiation of 95%; and management with fixed rest period of 30 days. The experimental design was randomized blocks with two blocks and three replications within the block. The variables analyzed were pre-grazing height, total dry matter (TDM), percentage of leaf blade, stem and dead material and leaf: stem ratio. The management based on criterion for light interception showed greater canopy pre-grazing height, lower MST, higher percentage of leaves and lowest percentage of dead material and, consequently, higher leaf: stem. There was no effect of the management to percentage of stems. Management based on light interception, applied during the rainy season, influenced positively in the structural characteristics of the pasture during the dry period.

**Keywords:** *Brachiaria brizantha*, canopy height, lactating cows, rotational stocking.

## **Introdução**

O modelo de pastejo intermitente em sistema rotacionado configura-se como uma das principais modalidades para a intensificação da produção leiteira. Contudo, o método

de manejo deve basear-se em critérios que respeitem a dinâmica morfofisiológica da planta, garantindo assim, a sustentabilidade e a produtividade deste ecossistema (SBRISIA et al., 2001). Como propõem Pedreira et al. (2007), o período de descanso (PD) com base na interceptação luminosa de 95%, resulta em melhores características qualitativas e estruturais do pasto, quando comparado com PD com base em dias fixos.

Durante o outono e o inverno, a queda da temperatura e da precipitação, associada ao fotoperíodo mais curto, são os principais fatores à contribuir para a estacionalidade do crescimento forrageiro, sendo esta, a principal razão para redução na produtividade e qualidade da *B. brizantha* cv. Marandu (COSTA et al., 2006). Com o intuito de se melhor a perenidade e a produtividade do relvado, tanto na época das águas quanto na seca, se faz de grande importância compreender o comportamento vegetal durante o ciclo estacional (PEDREIRA & MATTOS, 1981). O manejo racional do pasto durante a primavera e o verão, pode contribuir para mitigar os efeitos deletérios na estação seca posterior.

Diante destas proposições, o presente estudo objetivou avaliar o efeito residual, decorrente de dois tratamentos impostos ao pasto durante o período chuvoso: 1) Manejo com período descanso determinado pela IRFA de 95% (RFA 95) e 2) Manejado com período de descanso fixo 30 dias (PDF 30).

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Campo Experimental José Henrique Bruschi pertencente à Embrapa Gado de Leite e localizado na Zona da Mata de Minas Gerais. As coordenadas geográficas do local são 21°33' de latitude Sul e 43°16' de longitude Oeste, a 410 metros de altitude. O clima da região segundo Koppen é do tipo Cwa (mesotérmico), verão chuvoso e inverno seco, entre os meses de junho a setembro. O período experimental foi compreendido entre Julho e Setembro de 2012, em uma área de quatro hectares de *B. brizantha* Jacq. cv. Marandu, implantada em solo classificado como Neossolo Flúvico Distrófico (EMBRAPA, 1999).

Foram utilizadas 16 vacas Holandês x Zebu, com peso vivo médio de 495 kg, distribuídas no delineamento de blocos casualizados, com dois tratamentos e duas repetições de área, constituídas de 11 piquetes de 850 m<sup>2</sup> cada. Os tratamentos foram aplicados durante a época chuvosa (novembro de 2011 a maio de 2012), quando as pastagens foram manejadas conforme os critérios de intervalo de descanso variável, indicado pela interceptação luminosa de 95%, ou fixo de 30 dias. Para este estudo, realizado na época seca subsequente, o manejo das pastagens seguiu protocolo de período de ocupação do piquete de três e PD fixo de 30 dias. Durante o período experimental a pastagem não foi adubada, tendo em vista a baixa eficiência de uso dos fertilizantes durante a época seca do ano.

A altura do dossel forrageiro foi monitorada antes da entrada dos animais no piquete (pré-pastejo), utilizando uma régua graduada em centímetros, sendo medidos 40 pontos aleatórios por piquete. Foram realizadas coletas de forragem em três pontos do piquete, representativos da condição do pasto (altura e cobertura), com o auxílio de uma moldura metálica de 0,50 x 0,50 m, ao nível do solo, a fim de se obter a massa verde (MV) em pré-pastejo, para cada tratamento.

Foram retiradas subamostras representativas da forragem coletada, as quais foram pré-secas em estufa de circulação forçada de ar a 55 °C por 72 horas, e posteriormente pesadas. Uma alíquota de peso conhecido e que representasse as amostras colhidas foi retirada para as estimativas da massa de forragem em pré-pastejo, das proporções de lâmina foliar, colmo (colmo + bainha) e material morto.

O valor da massa seca de forragem foi convertido para kg/ha e os componentes morfológicos foram expressos em porcentagem da massa seca total (MST) de forragem. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste F a 5% de probabilidade.



## Resultados e Discussão

Foi observado apenas efeito ( $P < 0,05$ ) do ciclo de pastejo para a variável altura do dossel forrageiro em pré-pastejo. A maior altura foi obtida no ciclo 1, com valor de 28,1 cm, sendo observado o valor de 22,6 cm no ciclo 2. Essa diferença pode ser decorrente da redução no fotoperíodo, temperatura e precipitação, com o avanço dos ciclos neste período.

Houve efeito ( $P < 0,05$ ) do ciclo de pastejo para a MST. O Maior valor foi observado no ciclo 2 (8099 kg MS/ha) pode ser atribuído ao stress hídrico, que estimula a planta forrageira a produzir maior quantidade de material senescente, o qual não é pastejado. Sendo assim, ocorreu acúmulo deste material ao longo dos ciclos, contribuindo para o maior acúmulo de material morto (MM) com reflexos na MST.

A proporção de folha foi influenciada ( $P < 0,05$ ) pelo manejo e pelo ciclo, não havendo interação ( $P > 0,05$ ) dos fatores estudados. A maior proporção de folhas foi observada na área manejada conforme RFA95, com valor médio de 30,6%, enquanto no manejo PDF30 foi obtido o valor de 24,8%. Esta maior proporção de folhas, a favor do manejo RFA95, pode derivar de uma melhor condição da reserva orgânica da população de plantas deste tratamento. Durante períodos e situações de stress (estação seca), a gramínea utiliza esta reserva para emissão de novas folhas e restituição da área foliar (SBRISIA et al., 2001). Segundo Pedreira et al. (2007), o manejo com base na IL de 95% durante a primavera/verão possibilita maior produção de folhas e menor acúmulo de biomassa em colmos, o que pode resultar em comportamento semelhante na estação seca.

Quanto ao efeito do ciclo de pastejo sobre a proporção de folhas, foi observado o valor de 32,8% no 1º ciclo, enquanto no 2º ciclo esse valor foi de 22,6%, resposta decorrente do menor crescimento da planta com o avançar da estação seca.

Para a proporção de colmo não foi observado efeito ( $P > 0,05$ ) do manejo ou do ciclo ou da interação estes fatores.

Foi observado efeito ( $P < 0,05$ ) do manejo e do ciclo para a proporção de material morto, não havendo interação ( $P > 0,05$ ) destes fatores. O pasto submetido ao manejo conforme a IL 95% apresentou menor proporção deste componente, em relação ao manejo com período de descanso de 30 dias, com valores médios de 37,3% e 46,3%, respectivamente. Esta resposta pode estar associada à utilização mais intensa do pasto manejado de acordo com a IL 95%, o que propicia menor senescência e, consequentemente, menor acúmulo de material morto.

Foi observado aumento da proporção de material morto com o avanço do ciclo de pastejo, sendo obtidos valores médios de 36,8 e 46,8%, no 1º e 2º ciclo, respectivamente. Esta resposta é decorrente do menor crescimento da planta, associado ao aumento na taxa de senescência nesse período.

A relação folha:colmo (F:C) foi influenciada ( $P < 0,05$ ) pelo manejo e pelo ciclo de pastejo. Foram obtidos valores de 1,28 e 0,80, respectivamente, para os manejos RFA 95 e PDF 30. Os maiores valores da relação F:C foram observados no 1º ciclo. As diferenças observadas, tanto em função do manejo quanto em função do ciclo de pastejo, estão associadas aos valores referentes à proporção de folhas.

## Conclusões

O manejo baseado na IL 95% possibilitou maior proporção de folhas e menor proporção de material morto na estação seca, o que pode resultar em melhora na forragem ofertada neste período, bem como influenciar positivamente no crescimento do pasto na próxima estação chuvosa.

## Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da bolsa de iniciação científica, e à Embrapa Gado de Leite pela oportunidade da realização do treinamento.

## Literatura Citada

COSTA, K.A.D.P.; ROSA, B.; OLIVEIRA, I.P.D.; CUSTÓDIO, D.P.; SILVA, D.C. Efeito da estacionalidade na produção de matéria seca e composição bromatológica da *Brachiaria brizantha* cv. Marandu. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, p.187-193, 2006.

EMBRAPA, S. **Sistema brasileiro de classificação de solos**. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 1999. 412 p.

PEDREIRA, B.C.E.; PEDREIRA, C.G.S.; SILVA, S.C.D. Estrutura do dossel e acúmulo de forragem de *Brachiaria brizantha* cultivar Xaraés em resposta a estratégias de pastejo. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.42, p.281-287, 2007.

PEDREIRA, J.; MATTOS, H. Crescimento estacional de vinte e cinco espécies ou variedades de capins. **Boletim de Indústria Animal**, v.38, p.117-143, 1981.

SBRISSIA, A.; SILVA, S.D.; SC, O. O ecossistema de pastagens ea produção animal. **Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.731-754, 2001.

# Desenvolvimento de metodologias para a identificação de patógenos em leite e produtos lácteos por meio de PCR em tempo real

Vieira, FO<sup>1</sup>; Fonseca, I<sup>2</sup>; Pinto, ISB<sup>3</sup>; Santos, ASO<sup>3</sup>; Martins, SAV<sup>1</sup>; Fogaça, GN<sup>1</sup>; Lima, KR<sup>4</sup>; Martins, MF<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG  
felipe\_vieira89@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>4</sup>Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG

<sup>5</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Resumo:** A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro, sendo o país o quinto maior produtor mundial. Estimativas apontam que em curto prazo o Brasil se tornará um dos maiores exportadores de produtos lácteos do mundo. Com isso, essa cadeia precisa se preparar para alguns problemas que possam surgir. Estes problemas estão ligados principalmente à segurança do alimento e garantia de qualidade dos produtos. Produtos lácteos podem ser veículo de disseminação de micro-organismos patogênicos, por isso, este projeto visa desenvolver e validar uma metodologia que torne a detecção mais rápida e precisa destes patógenos. Para isso, serão utilizadas as metodologias de PCR em tempo real juntamente com a utilização de intercalantes de DNA, para a detecção somente de células viáveis do patógeno alvo. Para cada reação, um cultivo ativo de cultura padrão foi dividido, uma parte foi submetida a tratamento térmico para ter apenas células mortas. Em seguida, as amostras foram plaqueadas para contagem de unidades formadoras de colônias. Volumes variáveis de uma solução estoque de corante foram adicionados a tubos contendo o cultivo tratado termicamente e a outros tubos com cultivo não tratado. Os tubos foram mantidos em ambiente escuro e em seguida expostos à luz, para ativação e fotólise. Em seguida foi realizada a extração de DNA e PCR em tempo real. Os multiplex *Salmonella* + *S. aureus* e *E.coli* + *Listeria* foram estabelecidos com sucesso utilizando os *primers* e sondas necessários.

**Palavras-chave:** PCR em tempo real, PMA, patógenos.

**Abstract:** The milk production chain is one of the most important Brazilian agribusiness, and the country's fifth largest producer. Estimates suggest that in the short term, Brazil will become one of the largest exporters of dairy products in the world. Thus, this chain needs to prepare for some problems that may arise. These problems are mainly related to food safety and quality assurance of products. Dairy products can be a vehicle for dissemination of pathogenic microorganisms, so this project aims to develop and validate a methodology that makes faster and more accurate detection of these pathogens. To this end, the methods are used in real time PCR with the use of intercalating DNA to detect only viable cells in the target pathogen. For each reaction a active growing standard culture was divided, part was subjected to heat treatment to have only dead cells. Then the samples were plated to count colony-forming units. Varying volumes of a dye stock solution were added to tubes containing the heat-treated culture tubes and the other untreated culture. The tubes were kept in the dark and then exposed to light for activation and photolysis. Then was performed DNA extraction and real-time PCR. The multiplex *Salmonella* + *S. aureus* and *E.coli* + *Listeria* were successfully established using primers and probes required.

**Keywords:** real-time PCR, PMA, pathogens.

## Introdução

Com a crescente produtividade do leite no Brasil, que é um grande exportador de seus derivados, surge uma preocupação com problemas que possam ocorrer nesta cadeia produtiva. Estes problemas estão ligados principalmente à segurança do alimento e garantia de qualidade dos produtos. É de conhecimento geral que há um grande risco de disseminação de micro-organismos patogênicos em queijos, produto muitas vezes produzido sem padrões de qualidade higiênico-sanitária. Programas de controle de qualidade microbiológica são empregados para minimizar o risco de infecção e/ou intoxicação, que são baseados na capacidade de detectar os mais variados tipos de patógenos, e constituem uma poderosa ferramenta para a implementação de medidas de vigilância sanitária, monitoramento, garantia do alimento seguro e da qualidade dos produtos.

O desenvolvimento de metodologias moleculares para a detecção de bactérias pode ajudar para a melhoria da qualidade do produto. Os métodos que utilizam PCR em tempo real (qPCR) e espectrofotometria possibilitam um diagnóstico mais rápido e detalhado dos micro-organismos presentes no leite e seus derivados. A grande inovação desta metodologia é que, pela utilização de intercalantes de DNA, é possível detectar somente células viáveis do patógeno alvo, dando um diagnóstico mais rápido preciso dos patógenos presentes nestes alimentos. Posteriormente, estas metodologias desenvolvidas poderão ser utilizadas em produtos de mercado.

O objetivo deste trabalho é desenvolver metodologias moleculares para a detecção de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, por meio de qPCR, com amplificação apenas de células viáveis destes patógenos e possibilitar de forma rápida a padronização e o monitoramento da produção de produtos lácteos.

## Material e Métodos

Foram utilizadas as seguintes estirpes-padrão para a padronização das reações de qPCR: *Staphylococcus aureus* ATCC 51651 CNPGL 7771, *Salmonella* IAL 1472 CNPGL 5153, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 CNPGL 5779, e *Escherichia coli* O157:H7 IAL 1848 CNPGL 5785. As culturas foram crescidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* – DIFCO) acrescido de 0,6% de extrato de levedura a 37 °C por 24 horas. Depois do crescimento as culturas foram aliquotadas em microtubos de 1,5 mL e centrifugadas, o pelete foi lavado e eluído em PBS 1X com um volume final de 500 µL. Metade das amostras contendo células vivas foi submetida a tratamento térmico a 100 °C por 15 minutos, para inviabilizar estas células, em seguida congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C. A outra metade foi apenas congelada em nitrogênio líquido e mantida a -80 °C, sem perder a viabilidade das mesmas. Para verificar se o tratamento térmico foi eficiente, alíquotas de células viáveis e não viáveis (tratadas termicamente) foram colocadas para crescer em caldo BHI durante 72 horas a 37 °C e com agitação de 150 rpm, foram realizadas leituras diárias para verificar se houve crescimento.

As alíquotas das células viáveis e inviáveis foram então submetidas ao tratamento com o corante Propidium Monoazide (PMA). O corante foi adicionado às amostras em concentrações de 10 µM e 50 µM e incubadas no escuro por 20 minutos. O corante foi ativado pela exposição à luz halógena de 650 W durante 10 minutos, com eventuais agitações e mudança na posição dos tubos das amostras para uma absorção mais homogênea da luz.

O DNA das células viáveis e inviáveis, tratadas e não tratadas com PMA foi extraído com o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com protocolo estabelecido pelo fabricante. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA de todas as extrações foram feitas por meio de espectrofotometria (Nanodrop®1000 Technologies, Wilmington, DE, EUA).

As reações de qPCR foram feitas utilizando-se o TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do

fabricante. Os *primers* e sondas utilizados foram desenhados a partir de sequências depositadas no GenBank. Cada amostra foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no ABI Prism 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems). Cada reação teve o volume final de 25  $\mu$ L, com 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por um minuto (anelamento e extensão). Além de utilizar DNA, *primers* e sondas das bactérias de interesse, foram feitas também reações de qPCR em multiplex, com DNA de apenas de células viáveis de duas espécies de bactérias por vez junto com o plasmídeo pUC 18 como controle interno de amplificação (IAC). No primeiro teste foram utilizadas cinco concentrações deste IAC (2 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng e 2 ng por reação) para testar a sua interferência. Para a determinação das melhores condições nas reações em multiplex, foram realizados testes envolvendo todas as possíveis combinações das bactérias duas a duas, na presença e na ausência de IAC.

## Resultados e Discussão

A concentração de IAC acima de 2 pg impediu a amplificação do DNA das bactérias. Quando os testes para padronização das reações de PCR em multiplex incluiu as concentrações de 10 pg, 100 pg, 1 ng e 2 ng de IAC, somente este fragmento amplificava, mesmo com maiores concentrações de DNA das bactérias alvo. Dois multiplex foram estabelecidos (*Salmonella* + *S. aureus* e *E. coli* + *Listeria*), porém apenas na ausência de IAC. O tratamento térmico foi eficiente, leituras após 24 horas confirmaram o crescimento das bactérias que não sofreram este tratamento. Já as amostras tratadas termicamente não apresentaram crescimento após 72 horas. O tratamento com PMA tem como finalidade impedir a amplificação do DNA tratado com este corante, pois ele penetra pelos poros da membrana e/ou parede celular de células mortas e se intercalar entre as duplas fitas de DNA. Porém, em todas as reações de qPCR realizadas com amostras tratadas com este corante apresentaram amplificação, assim, ainda não foi possível estabelecer as melhores condições para a ligação deste corante à molécula de DNA. A próxima etapa do projeto será estabelecer o protocolo para o tratamento com PMA, como concentração do corante, distância entre as amostras e a fonte de luz, tempo de incubação e exposição à luz, para que este não permita a amplificação do DNA das células inviáveis. Também será testado o tratamento com outro intercalante, o corante EMA (brometo de etídio monoazida) o qual age basicamente da mesma forma que o PMA, mas pode apresentar resultados mais satisfatórios.

## Conclusões

Dois multiplex foram estabelecidos para a identificação de duas espécies de bactérias ao mesmo tempo. Como o IAC apresentou uma grande interferência na amplificação e é utilizado apenas como controle de amplificação, ele não será utilizado nas reações de qPCR nesta etapa do projeto. O trabalho está em andamento para se estabelecer o melhor protocolo para inativação dos micro-organismos e introdução do corante em suas moléculas de DNA. Estabelecidos estes protocolos, eles serão aplicados em queijo Minas Padrão e de Coalho encontrados no mercado.

## Agradecimentos

Ao CNPq.

## Literatura Citada

HOOFFAR, J.; COOK, N.; MALORNY, B.; WAGNER, M.; MEDICI, D.; ABDULMAWJOOD, A.; FACH, P. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5835, 2003.

MALORNY, B., PACCASSONI, F., FACH, P., BUNGE, C., MARTIN, A., HELMUTH, R., Diagnostic real-time PCR for the detection of *Salmonella* in food. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p. 7046-7052, 2004.

MALORNY, B.; WAGNER, M. Detection of *Enterobacter sakazakii* Strains by Real-Time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1623-1267, 2005.

WANG, S.; LEVIN, R.E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. **Journal of Microbiology Methods**, v. 64, p. 1-8, 2006.

# **Identificação e caracterização de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas de mastite bovina**

## **Identification and characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from bovine mastitis**

Carla Christine Lange<sup>1</sup>, Maria Aparecida V. P. Brito<sup>1</sup>, Marco Antônio Machado<sup>1</sup>, Daniele Ribeiro de L. Reis<sup>1</sup>, Igor Rosa Meurer<sup>2</sup>, Rafaela Soares de Mendonça<sup>3</sup>, Bianca Larcher Oliveira<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Pesquisador/Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

<sup>2</sup>Graduado em Farmácia pela Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF)

<sup>3</sup>Estudante de Biomedicina, Universidade Presidente Antônio Carlos (Unipac), Juiz de Fora

<sup>4</sup>Estudante de Biologia, Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora (CES-JF)

**Resumo:** *Staphylococcus aureus* é um patógeno primário da mastite bovina, responsável por infecções clínicas e subclínicas e altas contagens de células somáticas no leite. O objetivo deste trabalho foi identificar *S. aureus* de mastite bovina utilizando técnicas fenotípicas e moleculares e comparar os resultados obtidos pelas diferentes técnicas. Trinta e um *S. aureus* identificados pelo sequenciamento parcial do rDNA 16S foram testados quanto à produção de coagulase livre com plasma de coelho de duas diferentes marcas e quanto à produção de acetoina. Foram ainda submetidos a um teste rápido de aglutinação em látex para identificação de *S. aureus* e à pesquisa dos genes *coa* e *femA* por PCR. Em relação ao sequenciamento do rDNA 16S, 28 dos 31 isolados sequenciados apresentaram 100% de similaridade com isolados da mesma espécie depositados no GenBank; três isolados apresentaram 98% de similaridade. Estes três isolados não amplificaram os genes *coa* e *femA*, específicos para *S. aureus*, e apresentaram resultado negativo para os testes de aglutinação em látex e coagulase, levando-nos a concluir que se trata de outra espécie do gênero *Staphylococcus*. Novo sequenciamento será realizado para elucidar a identificação dos mesmos. Dos 28 isolados identificados como *S. aureus* pelo sequenciamento e PCR dos genes *coa* e *femA*, seis não coagularam o plasma de coelho de duas diferentes marcas, sugerindo que a produção de coagulase não é uma característica sempre presente em isolados de *S. aureus* de mastite bovina.

**Palavras-chave:** coagulase, PCR do gene *coa*, PCR do gene *femA*, sequenciamento do rDNA 16S.

**Abstract:** *Staphylococcus aureus* is a primary pathogen of bovine mastitis, responsible for clinical and subclinical infections and high somatic cell counts in milk. The aim of this study was to identify *S. aureus* from bovine mastitis using phenotypic and molecular techniques and compare the results obtained by the different techniques. Thirty-one *S. aureus* identified by partial sequencing of the 16S rDNA were tested for free coagulase production in rabbit plasma of two different brands and their production of acetoin. They were further subjected to a quick latex agglutination test for identification of *S. aureus* and PCR of *coa* and *femA* genes. Regarding the sequencing of 16S rDNA, 28 of the 31 isolates sequenced showed 100% similarity with isolates of the same species deposited in GenBank, and three isolates showed 98% similarity. These three isolates did not amplify the genes *coa* and *femA*, specific for *S. aureus*, and presented negative results for the latex agglutination and coagulase tests, leading us to conclude that this is another species of the genus *Staphylococcus*. A new sequencing will be performed to elucidate the identification of these isolates. Of the 28 isolates identified as *S. aureus* by rDNA 16S sequencing and by *coa* and *femA* PCR, six did not coagulate rabbit plasma of two different brands, suggesting that coagulase production is a feature not always present in *S. aureus* isolated from bovine mastitis.

**Keywords:** staphylocoagulase, *coa* PCR, *femA* PCR, 16S rDNA sequencing.

## Introdução

A mastite é uma doença multifatorial, responsável por grandes prejuízos econômicos no mundo inteiro. Bactérias do gênero *Staphylococcus* estão entre os principais agentes etiológicos da mastite bovina. Entre as espécies mais frequentemente isoladas, *Staphylococcus aureus* é um patógeno primário, responsável por infecções clínicas e subclínicas e altas contagens de células somáticas (CCS) no leite. Uma identificação acurada de bactérias envolvendo mastite bovina é essencial. Isso é particularmente verdade para os estafilococos, uma vez que o prognóstico de cura e a situação epidemiológica do rebanho diferem muito se a infecção for causada pela espécie *S. aureus* ou por outras espécies de *Staphylococcus* (BARKEMA et al., 2006).

As espécies do gênero *Staphylococcus* podem ser identificadas com base em características fenotípicas ou moleculares. O *National Mastitis Council* (NMC, 2004) recomenda, para o diagnóstico de *S. aureus* de mastite, os testes de produção de coagulase e produção de acetoina e comenta sobre a utilização de testes de aglutinação em látex para a rápida identificação de *S. aureus* baseada na detecção de *clumping factor* e de proteína A. Dentre os testes moleculares, podem ser citados a reação de PCR para a amplificação de genes específicos e o sequenciamento de genes ou fragmentos desses para a identificação de espécies do gênero *Staphylococcus* (BANNERMAN, 2003). A identificação de *S. aureus* por PCR dos genes *coa* e *femA* e pelo sequenciamento do rDNA 16S já foi realizada por nosso grupo de pesquisa (LANGE et al., 1999 e 2011). O objetivo deste trabalho foi o de identificar *S. aureus* de mastite bovina utilizando técnicas fenotípicas e genotípicas e comparar os resultados obtidos pelas diferentes técnicas.

## Material e Métodos

O trabalho experimental foi realizado no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. Foram selecionadas 31 estirpes de *S. aureus*, que foram identificadas como tal pelo sequenciamento parcial do rDNA 16S, realizado como descrito em Lange et al. (2011). As estirpes estão preservadas a -20 °C e a -80 °C em meio de estoque apropriado e pertencem à Coleção de Microrganismos de interesse para a Agroindústria e Pecuária da Embrapa. Os microrganismos foram recuperados do estoque e mantidos em ágar infusão de cérebro e coração (BHI, Oxoid).

A produção de coagulase livre foi pesquisada com o teste de coagulase em tubo, utilizando plasma de coelho liofilizado das marcas Laborclin e Sigma, conforme as instruções dos fabricantes. A leitura foi realizada após 2 e 24 horas de incubação. *S. aureus* ATCC 51651 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizados com controles positivo e negativo da reação, respectivamente.

A produção de acetoina foi pesquisada com o teste de Voges-Proskauer (VP), método de Barrit, realizado de acordo com Hendrickson (1985). A leitura foi realizada após 5 dias de incubação. *S. aureus* ATCC 51651 e *S. intermedius* ATCC 29663 foram utilizados com controles positivo e negativo da reação, respectivamente.

Foi utilizado o teste de aglutinação em látex Pastorex Staph-Plus™ (BioRad Laboratories) para a identificação de *S. aureus*, de acordo com as instruções do fabricante. Trata-se de um teste rápido de aglutinação para a detecção simultânea de *clumping factor*, proteína A e polissacarídeos capsulares de *S. aureus*. O teste foi realizado conforme instruções do fabricante. Como controles positivo e negativo foram utilizadas as cepas-padrão *S. aureus* ATCC 51651 e *S. epidermidis* ATCC 12228.

A pesquisa dos genes *coa* e *femA* foi realizada por PCR, como descrito em Lange et al. (1999) e Lange et al. (2011). A extração de DNA dos isolados foi realizada como descrito por Rosec e Gigaud (2002). As reações foram realizadas em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700, Applied Biosystems) e os fragmentos de DNA amplificados foram visualizados após eletroforese em gel de agarose. O registro das imagens foi feito em fotodocumentador (Eagle Eye II, Stratagene). *S. aureus* ATCC 51651 e *S. epidermidis* ATCC 12228 foram utilizados com controles positivo e negativo das reações.



## Resultados e Discussão

Em 28 dos 31 isolados sequenciados, o fragmento de cerca de 536 pb sequenciado alinhou em toda a sua extensão (100% de similaridade) com isolados de *S. aureus* depositados no GenBank. Três isolados apresentaram 98% de similaridade com as sequências depositadas. Os resultados do sequenciamento e dos outros testes podem ser vistos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Características fenotípicas e genotípicas de 31 isolados identificados como *S. aureus* pelo sequenciamento parcial do gene rDNA 16S.

Nº isolados	Coagulase 1	Coagulase 2	VP	Aglutinação em látex	PCR <i>femA</i>	PCR <i>coa</i>	Sequenciamento rDNA 16S *
17	+	+	+	+	+	+	100%
1	+	+	+	+ fraco	+	+	100%
1	+	+	-	+	+	+	100%
3	-	+	+	+	+	+	100%
6	-	-	+	+	+	+	100%
3	-	-	+	-	-	-	98%
Total: 31							

Coagulase 1 e 2: teste da coagulase em tubo com reagentes de marcas diferentes; VP: teste de Voges-Proskauer; \*percentagem de pares de bases idênticos a sequências depositadas no GenBank.

Dos 31 isolados analisados, doze apresentaram resultado negativo para o teste da coagulase com o reagente 1; nove desses isolados apresentaram resultado negativo também com o reagente 2. Segundo NMC (2002), pelo menos 95% dos isolados que apresentam reação positiva no teste da coagulase em quatro horas serão identificados como *S. aureus* por testes bioquímicos. Neste estudo nove isolados apresentaram resultado negativo para o teste da coagulase em tubo com reagentes de marcas diferentes, sendo seis deles identificados como *S. aureus* pelo sequenciamento do rDNA 16S e pela amplificação dos genes *coa* e *femA*.

No diagnóstico de mastite bovina a produção de acetoina é utilizada como uma característica diferencial entre *S. aureus* e duas outras espécies coagulase positivas, *S. intermedius* e *S. hyicus*, uma vez que o primeiro produz acetoina a partir de glicose e as duas últimas espécies não. No presente trabalho somente um isolado não produziu acetoina.

Um isolado apresentou um resultado fraco no teste de aglutinação em látex e três isolados apresentaram resultado negativo para este teste. Os mesmos três isolados que apresentaram resultado negativo para o teste de aglutinação em látex não coagularam o plasma de coelho e não amplificaram os genes *coa* e *femA*, específicos para *S. aureus*. Esses resultados sugerem que a identificação destes três isolados como *S. aureus* não está correta. Esses isolados foram identificados como *S. aureus* pelo sequenciamento parcial do rDNA 16S com uma percentagem baixa de similaridade com sequências de *S. aureus* depositadas no GenBank. Um novo sequenciamento deverá ser realizado para a identificação definitiva dos mesmos.

## Conclusões

Baseados nos resultados deste estudo, concluímos que para a identificação de *S. aureus* pelo sequenciamento do rDNA 16S deve ser observada uma percentagem de similaridade com sequências depositadas no GenBank superior a 98%. Seis dos 28 isolados identificados como *S. aureus* pelo sequenciamento e PCR dos genes *coa* e *femA* não coagularam o plasma de coelho de duas diferentes marcas, sugerindo que a produção de coagulase não é uma característica sempre presente em isolados de *S. aureus* de mastite bovina.

## Agradecimentos

À Fapemig, pelo apoio financeiro (APQ-00165-11) e bolsa de apoio técnico (BAT-II) concedida a Igor Rosa Meurer. Ao CNPq, pelas bolsas de iniciação científica (PIBIC) concedidas à Rafaela Soares de Mendonça e Bianca Larcher Oliveira.

## Literatura Citada

BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus, Micrococcus*, and other catalase-positive cocci that grow aerobically. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (Eds.). **Manual of Clinical Microbiology**. 8.ed. Washington: ASM, 2003. p. 384-404.

BARHEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, p. 1877–1895, 2006.

HENDRICKSON, D. A. Reagents and Stains. In: LENNETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER Jr., W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual of Clinical Microbiology**. 4.ed. Washington: ASM, 1985. p. 1093-1107.

LANGE, C.; CARDOSO, M.; SENCZEK, D.; SCHWARZ, S. Molecular subtyping of *Staphylococcus aureus* isolates from cases of bovine mastitis in Brazil. **Veterinary Microbiology**, v. 67, p. 27-141, 1999.

LANGE, C. C.; BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F.; ARCURI, E. F.; SOUZA, G. N.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; SALIMENA, A. P. S. Uso de PCR e sequenciamento do rDNA 16S para identificação de bactérias do gênero *Staphylococcus* isoladas de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 31, p. 36-40, 2011.

NATIONAL MASTITIS COUNCIL. **Microbiological procedures for the diagnosis of bovine udder infection and determination of milk quality**. 4.ed. Verona: National Mastitis Council. 2004. 47p.

ROSEC, J. P.; GIGAUD, O. Staphylococcal enterotoxin genes of classical and new types detected by PCR in France. **International Journal of Food Microbiology**, v. 77, p. 61-70, 2002.

# **Avaliação do leite desnatado e dos crioprotetores sacarose e sódio glutamato para preservação de bactérias liofilizadas**

## **Evaluation of skimmed milk and cryoprotectants sucrose and sodium glutamate to preserve freeze-dried bacteria**

Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito<sup>1</sup>, Janaína Miranda Barros<sup>2</sup>, Bianca Larcher Oliveira<sup>3</sup>, Rafaela Soares de Mendonça<sup>2</sup>, João Batista Ribeiro<sup>1</sup>, Marcos Aurélio Souto Silva<sup>4</sup>, Carla C. Lange<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup> Graduanda em Biomedicina, Faculdade Presidente Antonio Carlos, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup> Graduanda em Ciências Biológicas, Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>4</sup> Assistente de Pesquisa, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Resumo:** O processo de liofilização tem sido empregado para preservação de bactérias por longos períodos de tempo. Para isso, o meio usado no processo deve proteger a viabilidade bacteriana na etapa do congelamento e favorecer a preservação após a liofilização. Nesse estudo avaliou-se o leite desnatado e o leite desnatado adicionado de 5% de sacarose ou 5% de sódio glutamato para a preservação de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*. A viabilidade das bactérias foi determinada pela contagem bacteriana total das suspensões antes da liofilização e um dia, 30 e 90 dias após a liofilização. O leite desnatado, sem adição de crioprotetores, forneceu boas condições para a sobrevivência de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *S. uberis* até 90 dias após a liofilização. Para *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, o enriquecimento com sódio glutamato permitiu maior sobrevivência.

**Palavras-chave:** Liofilização, preservação de bactérias, leite desnatado, crioprotetores, sódio glutamato, sacarose.

**Abstract:** Lyophilization has been used to preserve bacteria during long periods. The medium employed in the process should protect the bacterial viability during the step of freezing and after lyophilization. In this study skimmed milk and skimmed milk with 5% sucrose, or 5% sodium glutamate were evaluated for the preservation of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase-negative, *Streptococcus agalactiae* and *Streptococcus uberis*. The strains viability was determined by total bacterial counting in the suspensions before lyophilization, on the first day and 30 and 90 days after lyophilization. Skimmed milk without addition of cryoprotectants, provided good conditions for survival of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *S. uberis* within 90 days after lyophilization. The viability of *Staphylococcus* spp. coagulase-negative was increased with addition of sodium glutamate.

**Keywords:** Lyophilization, preservation of bacteria, skimmed milk, cryoprotectants, sodium glutamate, sucrose.

## **Introdução**

A liofilização tem sido um método muito recomendado para a preservação de culturas bacterianas por longos períodos de tempo. Muitas bactérias fisiologicamente diversas e bacteriófagos têm sido preservados por essa técnica e têm permanecido viáveis por mais de 30 anos (GHERNA, 1981). Neste processo, a água da suspensão bacteriana congelada é removida por sublimação sob pressão reduzida. As células dessecadas podem ser estocadas por longos períodos, quando mantidas na ausência de oxigênio, umidade e luz. A qualquer momento poderão ser reidratadas e restauradas ao estado inicial (MORGAN et al., 2006).

Crioprotetores são adicionados ao meio usado para preparar a suspensão das culturas, como uma forma de proteção das membranas das células durante a etapa do congelamento

(REIMER; CARROL, 2003). A viabilidade celular após a liofilização varia de acordo com diversos fatores, incluindo a estirpe de microrganismo e a eficácia do agente protetor. Várias substâncias têm sido empregadas com essa finalidade, entre elas citam-se sacarose, lactose, trealose, glicerol, sódio glutamato, adonitol, peptona, dextrano, DMSO-dimetil sulfóxido (REIMER; CARROL, 2003).

A Embrapa Gado de Leite possui uma coleção de microrganismos (Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária), que é mantida congelada a -20 e -80 °C. O processo de liofilização será introduzido para a preservação das linhagens. O leite desnatado combinado ou não com agentes crioprotetores tem sido empregado na liofilização de diversos microrganismos. O objetivo desse estudo foi avaliar o leite desnatado isoladamente e em combinação com dois agentes crioprotetores (sacarose e sódio glutamato) para a liofilização de bactérias dos gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, que representam a maioria das espécies mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária.

## Material e Métodos

Os meios empregados foram o leite desnatado (Difco 0032-17) a 10% (p/v), e o mesmo leite desnatado contendo 5% de sódio glutamato (p/v) ou 5% de sacarose (p/v) (TRISIC-MILANOVIC et al., 2001 e MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000). Foram testadas as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo (STACN), *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*. As bactérias foram cultivadas em ágar sangue e o cultivo foi coletado com *swab* estéril e homogeneizado em 5,0 mL do meio de liofilização.

Após preparadas as suspensões bacterianas, separou-se 1,0 mL para contagem total de bactérias. O restante da suspensão foi distribuído em volumes de 0,5 mL nos frascos de liofilização estéreis. Os frascos foram vedados com as tampas de borracha estéreis, sem pressionar completamente, cobertos com papel alumínio, e levados para congelamento em ultrafreezer (-70 °C) por 18 horas (NEI, 1964). Após o processo de liofilização, os frascos foram fechados sob vácuo, retirados do liofilizador, fechados com tampas de alumínio e armazenados em geladeira. Para avaliar a viabilidade das células bacterianas, foram realizadas contagens totais de bactérias com um dia e 30 e 90 dias após a liofilização.

As contagens totais de bactérias foram realizadas, empregando-se como diluente solução salina estéril (0,85% NaCl p/v). As amostras liofilizadas foram reconstituídas adicionando-se 0,5 mL de solução salina estéril. Diluições  $\log_{10}$  foram preparadas e 0,1 mL de cada diluição foi inoculado na superfície de duas placas contendo agar BHI (*Brain Heart Infusion Agar*). As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas e as colônias presentes foram contadas. Calculou-se a média aritmética do número de colônias encontradas nas placas, e multiplicou-se o número de colônias encontradas pelos valores das diluições utilizadas.

## Resultados e Discussão

A concentração de células das suspensões *S. aureus*, STACN, *S. agalactiae* e *S. uberis* nos três meios antes da liofilização, variou de  $4,0 \times 10^7$  a  $4,7 \times 10^{11}$  UFC/mL (Tabela 1). Essa concentração estava dentro da faixa esperada para maior eficiência do processo, que deve ser  $\leq 1,0 \times 10^7$  UFC/mL (MORGAN et al., 2006).

Como pode ser verificado (Tabela 1), até o período de 90 dias, houve uma queda na concentração bacteriana em relação à obtida um dia após a liofilização. Essa queda foi variável entre as bactérias e os meios usados. A menor contagem de *S. aureus* após 90 dias de liofilização foi obtida no leite em pó com 5% de sódio glutamato, para os outros dois meios as contagens foram iguais ( $2,3 \times 10^9$  UFC/mL). O leite em pó sem agente protetor também proporcionou maior recuperação de *S. agalactiae* e *S. uberis* aos 90 dias ( $1,9 \times 10^7$  UFC/mL e  $6,0 \times 10^7$  UFC/mL, respectivamente). A maior contagem de STACN aos 90 dias foi no leite em pó enriquecido com 5% de sódio glutamato ( $1,6 \times 10^8$  UFC/mL), indicando que o sódio glutamato aumentou a estabilidade de STACN durante a preservação.

Considerando os meios em que se obteve maior recuperação de sobreviventes, foram calculadas as taxas de sobrevivência após 90 dias, em relação à densidade de células no dia 1 após a liofilização (MIYAMOTO-SHINOHARA et al., 2000). Uma taxa de sobreviventes de 0,1%

da população original de células é considerada suficiente para permitir a preservação da linhagem celular após a liofilização (BOZOGLU et al., 1987). Foram obtidas as seguintes taxas de sobrevivência: 1,1% para *S. aureus*, 15% para *S. agalactiae* e 6,7% para *S. uberis*. A taxa de sobreviventes não foi calculada para STACN, pois devido a problemas técnicos a contagem obtida no dia 1 após a liofilização ( $1,7 \times 10^6$  UFC/mL) foi menor do que a obtida após 90 dias ( $1,6 \times 10^8$  UFC/mL).

**Tabela 1.** Contagem bacteriana total (UFC/mL) das suspensões de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis*, antes da liofilização e um, 30 e 90 dias após a liofilização.

Bactérias	Meios	Antes	Após a liofilização		
			01 dia	30 dias	90 dias
<i>Staphylococcus aureus</i>	10% leite desnatado	$4,7 \times 10^{11}$	$2,1 \times 10^{11}$	$9,9 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^9$
	10% leite + 5% sódio glutamato	$1,1 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{11}$	$7,6 \times 10^{10}$	$6,6 \times 10^8$
	10% leite + 5% sacarose	$1,9 \times 10^{11}$	$2,2 \times 10^{11}$	$7,5 \times 10^{10}$	$2,3 \times 10^9$
STCN <sup>1</sup>	10% leite desnatado	$4,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^7$	$7,0 \times 10^7$	$2,4 \times 10^7$
	10% leite + 5% sódio glutamato	-	$1,7 \times 10^6$	$4,8 \times 10^8$	$1,6 \times 10^8$
	10% leite + 5% sacarose	$1,0 \times 10^8$	$3,6 \times 10^7$	$4,4 \times 10^8$	$6,0 \times 10^7$
<i>Streptococcus agalactiae</i>	10% leite desnatado	$3,3 \times 10^8$	$1,2 \times 10^8$	$7,7 \times 10^6$	$1,9 \times 10^7$
	10% leite + 5% sódio glutamato	$1,0 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$8,4 \times 10^7$	$1,9 \times 10^7$
	10% leite + 5% sacarose	$3,3 \times 10^8$	$3,8 \times 10^7$	$4,5 \times 10^7$	$3,3 \times 10^6$
<i>Streptococcus uberis</i>	10% leite desnatado	$5,0 \times 10^8$	$9,0 \times 10^8$	$1,4 \times 10^7$	$6,0 \times 10^7$
	10% leite + 5% sódio glutamato	$4,0 \times 10^8$	$3,1 \times 10^8$	$7,1 \times 10^7$	$1,2 \times 10^7$
	10% leite + 5% sacarose	$4,3 \times 10^8$	$3,4 \times 10^8$	$9,0 \times 10^7$	$5,6 \times 10^7$

<sup>1</sup> STACN: *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo.

## Conclusões

O leite desnatado sem adição de crioprotetores forneceu boas condições de sobrevivência para *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* até 90 dias após a liofilização. Para *Staphylococcus* spp. coagulase-negativo, o enriquecimento com sódio glutamato favoreceu a maior sobrevivência.

## Agradecimentos

Ao CNPq, pela bolsa PIBIC concedida à Bianca Larcher Oliveira (período 08/2012 a 04/2013) e à Janaína Miranda Barros (período 05 a 07/2013).

## Literatura Citada

BOZOGLU, T. F.; OZILGEN, M.; BAKIR, U. Survival kinetics of lactic acid starter cultures during and after freeze drying. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 9, p. 531-537, 1987.

GHERNA, R. L. Preservation. In: GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; COSTLOW, R. N.; NESTER, E. W.; WOOD, W. A.; KRIEG, N. R.; PHILLIPS, G. B. (ed). **Manual of Methods for General Microbiology**. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, p. 208-217, 1981.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying; a review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 183-193, 2006.

MIYAMOTO-SHINOHARA, Y.; IMAIZUMI, T.; SUKENOBE, J.; MURAKAMI, Y.; KAWAMURA, S.; KOMATSU, Y. Survival rate of microbes after freeze-drying and long-term storage. **Cryobiology**, v. 41, p. 251-255, 2000.

NEI, T. Freezing and freezing-drying of microorganisms, **Cryobiology**, v. 1, n. 1, p. 87-93, 1964.

REIMER, L. G.; CARROL, K. C. Procedures for the storage of microorganisms. In: MURRAY, P. R.; BARON, E. J.; JORGENSEN, J. H.; PFALLER, M. A.; YOLKEN, R. H. (ed) **Manual of Clinical Microbiology**, 8 ed. Vol. 1. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, p. 67-73, 2003.

TRŠIĆ-MILANOVIĆ, N.; KODŽIĆ, A.; BARAS, J.; ĐIMIĆ-ĐEVIĆ-BRANKOVIĆ, S. The influence of a cryoprotective medium containing glycerol on the lyophilization of lactic acid bacteria. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 66, n. 7, p. 435-441, 2001.

# **Produção de manteigas naturalmente enriquecidas com CLA *cis*-9 *trans*-11 como fonte de matéria prima para formulações cosméticas nanoestruturadas<sup>1</sup>**

## **Production of naturally *cis*-9 *trans*-11 CLA enriched butter as material source for nanostructured cosmetic formulations**

Mariana Macedo de Almeida<sup>2</sup>, Humberto de Mello Brandão<sup>3</sup>, Marco Antônio Sundfeld da Gama<sup>4</sup>, Carlos Gustavo Santos Ribeiro<sup>5</sup>, Bárbara Cardoso da Mata e Silva<sup>6</sup>, Mirton José Frota Morenz<sup>7</sup>, Carollina Banni Alevato<sup>8</sup>, Fernando César Ferraz Lopes<sup>9</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pela Fapemig, Embrapa e CNPq

<sup>2</sup>Graduanda em Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. Bolsista CNPq. e-mail: marimacedoa@hotmail.com

<sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. e-mail: humberto.brandao@embrapa.br

<sup>4</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. e-mail: marco.gama@embrapa.br

<sup>5</sup>Doutorando, Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFMG. Bolsista Capes. e-mail: bacaribeiro@ig.com.br

<sup>6</sup>Doutoranda, Programa de Pós-graduação em Zootecnia da UFMG. Bolsista CNPq. e-mail: barbaracmsilva@yahoo.com.br

<sup>7</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora. e-mail: mirton.morenz@embrapa.br

<sup>8</sup>Biomédica, Bolsista de Apoio Técnico do CNPq. e-mail: carollbanni@hotmail.com

<sup>9</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG. e-mail: fernando.lopes@embrapa.br

**Resumo:** O objetivo do trabalho foi produzir manteigas naturalmente enriquecidas com os ácidos rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11) e vacênico (C18:1 *trans*-11) para poderem ser utilizadas como matéria-prima para a fabricação de creme hidratante de uso tópico para humanos, por meio de formulações nanoestruturadas. Foram produzidas nove manteigas nas seguintes condições experimentais: 1) vacas recebendo 1,5; 3,0 ou 4,5% de óleo de soja na matéria seca (MS) de dietas baseadas em capim-elefante picado; 2) vacas recebendo silagem de milho e concentrado sem óleo de girassol (OG), ou recebendo 4,5% de OG na MS de dieta baseada em capim-elefante picado; e 3) vacas sob pastejo em capim-Marandu suplementado ou não com OG, na base de 3,0% da MS da dieta. Nesta última condição, foram produzidas manteigas dos leites obtidos nas duas ordenhas diárias, sendo observadas maiores concentrações dos ácidos rumênico e vacênico nas manteigas oriundas do leite da ordenha da tarde. A inclusão de óleos vegetais nas dietas permitiu a produção das manteigas com os maiores teores dos ácidos rumênico e vacênico. Estas manteigas apresentaram ainda as maiores concentrações de ácidos graxos monoinsaturados e de poli-insaturados, e menores teores de ácidos graxos saturados, características estas vantajosas para a tecnologia farmacêutica no momento da preparação da formulação cosmética, haja vista o menor ponto de fusão destas manteigas e potencialmente maior viscosidade.

**Palavras-chave:** ácido rumênico, ácido vacênico, *Brachiaria brizantha*, óleo de girassol, óleo de soja, *Pennisetum purpureum*.

**Abstract:** The aim of this study was to produce butter naturally enriched in rumenic (CLA *cis*-9 *trans*-11; RA) and vaccenic (C18:1 *trans*-11; VA) acids in order to use it for the development of a nanostructured topical moisturizing cream for humans. Nine different types of butter were produced from milk of cows fed the following experimental diets: 1) Total mixed ration (TMR) containing 1.5, 3.0 and 4.5% of soybean oil (% of diet DM) and chopped elephant grass as the forage component; 2) TMR containing no sunflower oil and corn silage as the forage component; 3) TMR containing 4.5% DM and chopped elephant grass as the forage component; and 4) Marandu grass pasture supplemented or not with sunflower oil at 3.0% DM. Butter from both morning and afternoon milking were produced

in response to experimental diet 4, with higher milk fat RA and VA contents being observed in butter produced from afternoon milk. The inclusion of plant oils in the diets resulted in butter with higher RA and VA contents. In addition, these high RA/VA butters also had higher contents of mono and polyunsaturated fatty acids, and lower saturated fatty acids, which may be advantageous for the preparation of the nanostructured cream due to the lower melting point and increased viscosity of the butter.

**Keywords:** *Brachiaria brizantha*, *Pennisetum purpureum*, rumenic acid, soybean oil, sunflower oil, vaccenic acid.

## Introdução

Há vários séculos o leite e os produtos lácteos são consumidos pela humanidade, por sua importância nutricional como fontes naturais de proteína de elevado valor biológico, de vitaminas, de cálcio e outros minerais, substâncias estas indispensáveis para promoção da saúde humana (PALMQUIST, 2010). No entanto, críticas ao consumo *ad libitum* destes alimentos têm sido relatadas, principalmente, em resposta à concentração de ácidos graxos saturados de cadeia média de sua gordura, considerados hipercolesterolêmicos e aterogênicos pela comunidade médica. Por esta razão, nas últimas décadas, em muitas regiões, tem sido observada redução no consumo *per capita* de lácteos, e dentre estes, de manteiga (LUBARY et al., 2011).

Por outro lado, na gordura do leite e dos derivados lácteos estão naturalmente presentes componentes bioativos como o ácido rumênico (CLA *cis*-9 *trans*-11), cujas propriedades anticarcinogênicas, antiaterogênicas, antidiabetogênicas (Diabetes do Tipo II) e imunomodulatórias têm sido relatadas em diversos trabalhos (PALMQUIST, 2010; LOPES et al., 2011). Diante das crescentes evidências científicas dos efeitos positivos à saúde humana promovidos pelo ácido rumênico e pelo fato da gordura do leite e de derivados lácteos ser a principal fonte deste ácido graxo na dieta humana, grandes esforços têm sido feitos pela pesquisa para aumentar sua concentração no leite, bem como do ácido vacênico, haja vista que, aproximadamente, 20% da quantidade ingerida deste ácido graxo pode ser convertida em ácido rumênico no metabolismo humano (TURPENEIN et al., 2002).

O ácido rumênico é o principal isômero de CLA (do inglês *conjugated linoleic acids*) encontrado na gordura do leite (75 a 90% do CLA total) e sua concentração varia amplamente. Dos fatores que contribuem para esta variação, a dieta é, indubitavelmente, o mais importante. Em trabalhos no Brasil, a suplementação de dietas de vacas leiteiras com fontes lipídicas ricas em ácidos oleico (C18:1 *cis*-9), linoleico (C18:2 *cis*-9 *cis*-12) e/ou  $\alpha$ -linolênico (C18:3 *cis*-9 *cis*-12 *cis*-15), tais como grãos de oleaginosas, mas, principalmente, óleos vegetais livres (e.g. óleos de soja e girassol) tem se mostrado eficiente estratégia nutricional para aumento dos teores dos ácidos rumênico e vacênico no leite (LOPES et al., 2011). No entanto, nos atuais sistemas de pagamento adotados pelas cooperativas e indústrias de lácteos no Brasil não é economicamente viável utilizar dietas suplementadas com óleos vegetais livres para produção de leite, haja vista que tais ingredientes são caros e não há bonificação da remuneração recebida pelo produtor rural pelo incremento nos teores dos ácidos rumênico e vacênico no leite (LOPES et al., 2012).

No contexto de revalorização da imagem da gordura do leite frente aos consumidores e, adicionalmente, de agregação de valor ao produto final, Lubary et al. (2011) relataram que estratégia eficiente para isto seria sua incorporação em produtos farmacêuticos ou cosméticos, uma vez que esses segmentos de mercado remuneram a matéria prima com valores, geralmente, mais elevados que aqueles praticados pela indústria alimentícia, além de, concomitantemente, estarem relacionados às áreas de saúde e estética, que apresentam grande apelo de *marketing*. Produtos inovadores, com maior valor agregado, permitem maior remuneração para o setor primário, bem como para as indústrias do ramo de lácteos e para o comércio de modo geral, já que a atividade leiteira no Brasil reveste-se de grande importância na geração de empregos diretos e indiretos, na provisão de renda para produtores rurais e na arrecadação de impostos.



Desta forma, uma promissora alternativa, com forte apelo comercial e de saúde, seria a aplicação da nanotecnologia para o desenvolvimento de cosméticos e fármacos, utilizando como matéria prima a gordura de manteiga naturalmente enriquecida com os ácidos rumênico e vacênico, produzida a partir de leite de vacas alimentadas com dietas suplementadas com óleos vegetais livres. Nesse contexto, a associação das vantagens inerentes às características físico-químicas das manteigas enriquecidas com estes ácidos graxos, que possuem atividade anti-inflamatória, e sua incorporação em sistemas carreadores lipídicos nanoestruturados capazes de permear o extrato córneo da pele após a administração tópica, pode permitir novas opções de tratamentos de inflamações dérmicas e produção de cosméticos.

O objetivo deste trabalho foi produzir manteigas naturalmente enriquecidas com os ácidos rumênico e vacênico, obtidas a partir de leite de vacas de raças leiteiras alimentadas com dietas baseadas em forrageiras tropicais suplementadas com óleos de soja ou de girassol.

## Material e Métodos

Todos os experimentos foram realizados no Campo Experimental José Henrique Bruschi, da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, na Zona da Mata do Estado de Minas Gerais.

Foram produzidas nove manteigas a partir de leite de vacas Holandês x Gir manejadas nas seguintes condições experimentais: 1) vacas recebendo capim-elefante (*Pennisetum purpureum*) picado, fornecido em mistura completa com concentrado, em dietas contendo 1,5; 3,0 ou 4,5% de óleo de soja (OS) na matéria seca (MS); 2) vacas recebendo silagem de milho e concentrado sem óleo de girassol (OG), ou recebendo capim-elefante picado fornecido em mistura completa com concentrado, em dieta contendo 4,5% de inclusão de OG na MS; e 3) vacas sob condição de pastejo rotacionado em capim-Marandu (*Brachiaria brizantha* cv. Marandu) suplementado com concentrado contendo ou não OG, na base de 3,0% da MS da dieta, fornecido em cocho individual no estábulo. Em todos estes experimentos foram adotadas duas ordenhas diárias, realizadas mecanicamente. Na condição experimental com vacas sob condição de pastejo rotacionado em capim-Marandu foram adicionalmente produzidas manteigas a partir de leite obtido nas duas ordenhas diárias. Não houve repetição de campo na produção de nenhuma das nove manteigas.

Todas as manteigas foram produzidas por processo semiartesanal descrito por Gonzalez et al. (2003). Resumidamente: ao final de cada ordenha, todo o leite obtido das vacas pertencentes à cada condição experimental foi acondicionado em latões com capacidade de 50 L, previamente identificados. No local de fabricação da manteiga, o leite de cada latão foi transferido para recipientes menores, aquecido a 45 a 50 °C e, em seguida, processado em desnatadeira elétrica (modelo 18GR, Casa das Desnatadeiras, Goiânia, GO) para separação do creme. Os cremes produzidos foram submetidos a processo de pasteurização lenta, a 65 °C a 68 °C, durante 30 min. Posteriormente, os cremes obtidos dos leites das ordenhas da manhã e da tarde de cada condição experimental, foram misturados e homogeneizados. Na fabricação das manteigas, não houve adição de sal, fermentos lácticos e corantes. Durante o processo de malaxagem, as manteigas foram lavadas com água fria e, depois de retirado o excesso de água, acondicionadas em potes plásticos previamente identificados, que foram adequadamente vedados para prevenir entrada de ar. Estes potes foram encaminhados ao Laboratório de Cromatografia da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG), onde foram armazenados (-20 °C), visando posterior determinação do perfil de ácidos graxos das manteigas.

As frações lipídicas das amostras foram previamente extraídas em solução de hexano-isopropanol (3:2). Antes da injeção no cromatógrafo, os extratos foram metilados em solução básica de metóxido de sódio. O perfil de ácidos graxos foi determinado em cromatógrafo de fase gasosa modelo 6890N (Agilent Technologies Inc., EUA) equipado com coluna capilar de sílica fundida CP-SIL 88 FAME (100 m x 0,25 mm x 0,2 µm) com fase estacionária de ciano propil siloxano (Varian Inc., Mississauga, Canadá) e detector de ionização de chama (FID), com condições de operação descritas por Cruz-Hernandez et al.

(2007), e *software* Agilent ChemStation (Agilent Technologies Inc., EUA). A identificação dos ésteres metílicos dos ácidos graxos foi realizada por comparação com os tempos de retenção observados em padrões comerciais e com base na literatura. A concentração (g/100 g de ácidos graxos totais) de cada ácido graxo presente nas amostras foi calculada a partir da multiplicação da relação da sua área sob a curva (pico) em relação à área total do cromatograma (%) pela produção diária de gordura total.

## Resultados e Discussão

As condições experimentais com inclusão de óleos vegetais nas dietas foram as que produziram manteigas com maiores teores de CLA *cis*-9 *trans*-11, que variaram de 1,26% a 3,48%. Por outro lado, os manejos nutricionais sem incorporação de óleo vegetal foram responsáveis pelas menores concentrações do isômero, 0,62% a 1,15% (Tabela 1). Isso ocorreu porque os óleos vegetais utilizados, tanto o de soja quanto o de girassol, são ricos em ácidos graxos poli-insaturados e monoinsaturados que sofrem biohidrogenação no trato gastrointestinal de ruminantes, produzindo ácidos graxos intermediários do processo, como isômeros *trans* e o CLA, que são absorvidos no intestino e secretados no leite (LOPES et al., 2011).

**Tabela 1.** Perfil de ácidos graxos (AG) das manteigas avaliadas<sup>1</sup>.

Ácido graxo (g/100 g de AG)	1,5%OS	3,0%OS	4,5%OS	4,5%OG	SM	0%OGM	0%OGT	3%OGM	3%OGT
Ácido rumênico	1,26	2,02	3,48	1,92	0,62	1,01	1,15	1,75	1,93
Ácido vacênico	3,21	6,13	9,32	5,44	1,45	1,71	1,79	3,41	3,22
Saturados	56,87	56,38	50,66	52,62	67,21	57,20	57,70	50,79	49,39
Monoinsaturados	32,78	32,49	37,65	40,03	26,29	28,89	29,15	37,07	38,66
Poli-insaturados	2,90	4,03	5,46	3,71	2,65	2,99	3,15	3,65	3,98

<sup>1</sup>Manteigas 1,5%OS, 3,0%OS e 4,5%OS: produzidas com os leites de vacas recebendo, respectivamente, 1,5; 3,0 ou 4,5% de óleo de soja na matéria seca (MS) de dietas à base de capim-elefante picado; Manteigas SM e 4,5%OG: respectivamente produzidas com os leites de vacas recebendo silagem de milho e concentrado sem óleo de girassol (OG), ou recebendo 4,5% de OG na MS de dieta baseada em capim-elefante picado; Manteigas 0%OG-M, 0%OG-T, 3%OG-M e 3%OG-T: produzidas com leites das ordenhas da manhã (-M) ou da tarde (-T) de vacas sob pastejo em capim-Marandu suplementado com concentrado sem (0%OG) ou com 3% (3%OG) de óleo de girassol. Os valores apresentados referem-se à média de análises realizadas em duplicata.

Considerando as dietas em que houve inclusão de óleo vegetal, a associação de capim-elefante picado, fornecido em mistura completa com concentrado contendo 4,5% de óleo de soja, foi a condição experimental na qual obteve-se maior teor de ácido rumênico (3,48%). Além disso, foi também por meio desse manejo nutricional que atingiu-se a maior concentração de ácido vacênico (9,32%), o que é relevante, haja vista a bioconversão em humanos, catalizada pela enzima  $\Delta^9$ -dessaturase, do C18:1 *trans*-11 a CLA *cis*-9 *trans*-11, em taxa, aproximadamente, de 19% (TURPEINEN et al., 2002). Dessa forma, os teores mais elevados de ácido rumênico e vacênico encontraram-se na mesma manteiga. Essa relação deve-se ao fato da maior parte da síntese de CLA *cis*-9 *trans*-11 no leite ser em decorrência da ação da  $\Delta^9$ -dessaturase sobre o C18:1 *trans*-11 (PALMQUIST, 2010; LOPES et al., 2011).

Quando comparou-se a concentração de ácido rumênico entre ordenhas (manhã e tarde) de vacas sob pastejo em capim-Marandu suplementado com 3,0% de óleo de girassol, observou-se que o maior teor de CLA *cis*-9 *trans*-11 foi obtido na ordenha da tarde (1,93%) comparado com aquele obtido na ordenha da manhã (1,75%). Esse resultado é similar ao que foi relatado por Lopes et al. (2011).

As manteigas oriundas dos leites das vacas que receberam as dietas com inclusão de óleos vegetais apresentaram concentrações de ácidos graxos monoinsaturados que variaram de 32,49% a 40,03%, e teores de ácidos graxos saturados entre 49,39% e 56,87%. Já as manteigas provenientes do leite de vacas submetidas à condição alimentar sem óleo vegetal apresentaram menores teores de monoinsaturados (26,29% a 29,15%) e maiores concentrações de saturados (57,20% a 67,21%). Além disso, a incorporação de 3,0% e 4,5% de óleo vegetal na dieta foi responsável pelos maiores teores de ácidos graxos poli-insaturados, em valores que variaram de 3,65% a 5,46%,

enquanto os teores desses ácidos graxos em dietas sem inclusão de óleo vegetal apresentaram-se entre 2,65% e 3,15% (Tabela 1). O aumento dos teores de monoinsaturados e poli-insaturados e a concomitante queda das concentrações dos saturados totais são responsáveis pela diminuição do ponto de fusão da manteiga (BULDO et al., 2013) e, conseqüentemente, redução da viscosidade (GONZALEZ et al., 2003). Essas características são vantajosas para a tecnologia farmacêutica no momento da preparação da formulação cosmética.

## Conclusões

O maior teor de ácido rumênico foi encontrado na manteiga produzida com leite proveniente de vacas Holandês x Gir recebendo capim-elefante picado fornecido em mistura completa com concentrado, em dieta contendo 4,5% de óleo de soja na matéria seca.

Manteigas produzidas a partir do leite de vacas sob manejo nutricional contendo óleo vegetal atingiram maiores teores de ácidos graxos totais monoinsaturados e poli-insaturados e menor concentração de ácidos graxos totais saturados, o que confere vantagens para a formulação cosmética.

## Agradecimentos

Ao CNPq

## Literatura citada

CRUZ-HERNANDEZ, C.; KRAMER, J.K.G.; KENNELLY, J.J. et al. Evaluating the conjugated linoleic acid trans 18:1 isomers in milk fat dairy cows fed increasing amounts of sunflower oil and a constant level of fish oil. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.3786-3801, 2007.

BULDO, P.; LARSEN, M.K.; WIKING, L. Multivariate data analysis for finding the relevant fatty acids contributing to the melting fractions of cream. **Journal of the Science of food and agriculture**, v.93, p.1620-1625, 2013.

GONZALEZ, S.; DUNCAN, S.E.; O'KEEFE, S.F. et al. Oxidation and textural characteristics of butter and ice cream with modified fatty acid profiles. **Journal Dairy Science**, v.86, p.70-77, 2003.

LOPES, F.C.F.; GAMA, M.A.S.; RIBEIRO, C.G.S. et al. Produção de leite com alto teor de CLA - Experiência brasileira. In: PEREIRA, L.G.R.; NOBRE, M.M. et al. (Org.). **Pesquisa, desenvolvimento e inovação para sustentabilidade da bovinocultura leiteira**. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, 2011, p.251-296.

LOPES, M.A.; LAGE, L.A.; LOPES, F.C.F. et al. Economic viability of feeding dairy cows on diets containing different levels of soybean oil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.41, p.2085-2091, 2012.

LUBARY, M.; XAND, G.W.H.; HORST, J.H. The potential of milk fat for the synthesis of valuable derivatives. **European Food Research Technology**, v.232, p.1-8, 2011.

PALMQUIST, D.L. Great discoveries of milk for a healthy diet and a healthy life. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, p.465-477, 2010 (supl. especial).

TURPEINEN, A.M.; MUTANEN, M.; ARO, A. et al. Bioconversion of vaccenic acid to conjugated linoleic acid in humans. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.76, p.504-510, 2002.

# ***Tithonia diversifolia* [Hemsl.] Gray associada à *Brachiaria brizantha*: composição bromatológica, cinética de fermentação ruminal e produção de metano *in vitro***

Person Luiz de Paula Silva<sup>1</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>2</sup>, Leonardo Henrique Ferreira Calsavara<sup>3</sup>, Sylvia Rocha e Silveira<sup>3</sup>, Rafael Sandin Ribeiro<sup>3</sup>, Dayana Carvalho<sup>3</sup>, Danielle Storino de Freitas<sup>3</sup>, João Paulo Sacramento<sup>3</sup>, Thierry Ribeiro Tomich<sup>2</sup>, Rogério Martins Maurício<sup>4\*</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq – Embrapa Gado de Leite, aluno do curso de graduação em Zootecnia da UFSJ

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, \*Bolsista de produtividade do CNPq

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Engenharia de biossistemas, Bolsistas da Capes

<sup>4</sup>Departamento de Engenharia de Biossistemas – DEPEB – UFSJ, Profº Adjunto da Universidade Federal de São João del-Rei

**Resumo:** Apesar da reconhecida importância da agropecuária para a produção de alimentos e a geração de renda, nos últimos anos tem ocorrido aumento das discussões sobre o impacto ambiental das atividades pecuárias e agrícolas, principalmente relativas ao aquecimento global, destacando-se a emissão de metano entérico pelos ruminantes. Foram avaliadas plantas de *T. diversifolia* em dois estágios de maturação e cinco níveis de substituição da *Brachiaria brizantha* quanto à composição bromatológica, à cinética de fermentação ruminal *in vitro*, à produção de ácidos graxos voláteis – AGV e à produção de metano. Os resultados apontam que a *T. diversifolia* apresenta qualidades nutricionais adequadas para nutrição de ruminantes, com elevados teores proteicos e reduzidos teores de fibra em detergente neutro – FDN e fibra em detergente ácido – FDA. Os níveis de substituição avaliados não influenciaram a produção de metano.

**Palavras-chave:** ácidos graxos voláteis, metano, produção de gases, ruminantes.

**Abstract:** Despite the recognized importance of agriculture for food production and income generation, in recent years, there has been increasing discussion about the environmental impact of agricultural and livestock activities, mainly related to global warming, especially enteric methane emissions by ruminants. *T. diversifolia* samples were evaluated in two growth stages and mixed with different inclusions of *Brachiaria Brizantha*. The mixed samples were analyzed in terms of chemical composition, *in vitro* fermentation kinetics, VFA and methane production. The results demonstrated that *T. diversifolia* has nutritional qualities for ruminant nutrition due to the high protein levels and low levels of NDF and ADF. In addition, it was also verified no effects of methane production.

**Key words:** fat acids, methane, gas production, ruminants.

## **Introdução**

A agropecuária mundial tem enfrentado situações desafiadoras. Ao mesmo tempo em que a demanda por alimentos vem aumentando sistematicamente, questões ambientais relacionadas principalmente à emissão de gases de efeito estufa (GEE) vêm pressionando o setor para se tornar mais eficiente na exploração dos recursos naturais. Varias estratégias são utilizadas com a finalidade de reduzir as emissões de metano, dentre elas há a possibilidade de utilização de alimentos alternativos com potencial para mitigação do metano entérico. Neste trabalho, objetivou-se avaliar a forrageira *T. diversifolia* associada à *Brachiaria brizantha* quanto à composição bromatológica, cinética de fermentação ruminal e produção de metano *in vitro*.

## Material e Métodos

Foram avaliadas plantas de *T. diversifolia* em dois estágios de desenvolvimento (emborrachamento e prefloração) e cinco níveis de substituição da *B. brizantha* cv. Marandu (0%, 25%, 50%, 75% e 100%). Procederam-se análises de composição bromatológica (FDN, FDA, hemiceluloses e proteína bruta – PB), cinética de fermentação ruminal, produção de AGV e produção de metano *in vitro*.

Para a avaliação da cinética de fermentação ruminal e produção de metano foi utilizada a técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases, segundo Maurício et al. (1999). A produção de gases foi mensurada 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 17, 20, 24, 28, 34, 48, 72, 96 horas após a incubação. A medição dos gases foi realizada com transdutor de pressão (DPI 705) e a conversão dos valores de libra por polegada quadrada (PSI) em volume foi realizada a partir da equação  $\text{Volume} = -0,0171 \text{ pressão}^2 + 3,0926 \text{ pressão} + 0,0078$ ;  $R^2 = 0,9877$ , estabelecida para as condições locais do laboratório. No tempo de 6 e 12 hs foram coletadas amostras de gases em exetainers para a determinação da concentração de metano em cromatógrafo a gás.

Adotou-se o modelo unicompartmental descrito por France et al. (1993) para a descrição da dinâmica de fermentação *in vitro* ruminal. Para a avaliação da produção de metano foi utilizado delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 5 x 3 (níveis de substituição x estágio de maturação) com três repetições. Os valores médios foram comparadas por meio do teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Os teores de FDN e hemiceluloses da *T. diversifolia* foram inferiores aos observados para *B. brizantha*. Consequentemente, houve redução significativa ( $P < 0,05$ ) nos teores desses constituintes com aumento do nível de inclusão de *T. diversifolia*. Não foram observadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) nos teores de FDN e hemicelulose na comparação entre as plantas de *T. diversifolia* coletadas no período de emborrachamento e prefloração. Já quanto aos teores de FDA, não foram verificadas diferenças significativas ( $P > 0,05$ ) na comparação entre plantas de *T. diversifolia* coletadas em diferentes estágios de desenvolvimento ou entre *T. diversifolia* e *B. brizantha* (Tabela 1). Observou-se superioridade ( $P < 0,05$ ) nos teores de PB da *T. diversifolia* coletada no período de emborrachamento (166,1 g/Kg MS) em relação às plantas coletadas no período de prefloração (117,2 g/Kg MS) (Tabela 1). Estes valores são elevados quando comparados aos frequentemente observados para diversas forrageiras tropicais. Dentre essas forrageiras, conforme Rodrigues et al. (2012), as gramíneas do gênero *Brachiaria* raramente alcançam níveis de PB acima 100 g/Kg MS, mesmo em condições adequadas de manejo. Contudo, a *B. brizantha* utilizada neste experimento apresentou elevado teor de PB (126,6 g/Kg MS). Isto se deve fato dessa forrageira ter sido proveniente de um sistema de manejo rotacionado, com aplicação de elevadas doses de nitrogênio. Por sua vez a *T. diversifolia* mesmo em condições edáficas desfavoráveis (pH ácido e baixos níveis de P e Ca, como foi caso das plantas coletadas para este experimento) apresentou teores de PB similar (prefloração) ou superior (emborrachamento) ao observado para *B. brizantha*.

**Tabela 1.** Valores de fibra insolúvel em detergente neutro (FDN), fibra insolúvel em detergente ácido (FDA), hemicelulose (HEM) e proteína bruta (PB) (g/Kg de MS) da *Tithonia diversifolia* em dois estágios de desenvolvimento e em diferentes níveis de substituição por *Brachiaria brizantha*

Estádio		Níveis de substituição de <i>T. diversifolia</i> por <i>B. brizantha</i>					CV (%)
		100%	75%	50%	25%	0%	
FDN	Emborrachamento	450,1 <sup>eA</sup>	498,5 <sup>dA</sup>	546,9 <sup>cA</sup>	595,4 <sup>bA</sup>	643,6 <sup>aA</sup>	3,3
	Prefloração	446,5 <sup>eA</sup>	495,9 <sup>dA</sup>	545,2 <sup>cA</sup>	594,5 <sup>bA</sup>	643,6 <sup>aA</sup>	
FDA	Emborrachamento	386,3 <sup>BA</sup>	379,2 <sup>BA</sup>	372,0 <sup>BA</sup>	364,8 <sup>BA</sup>	357,9 <sup>BA</sup>	3,4
	Prefloração	383,5 <sup>BA</sup>	377,0 <sup>BA</sup>	370,5 <sup>BA</sup>	364,1 <sup>BA</sup>	357,9 <sup>BA</sup>	
HEM	Emborrachamento	63,8 <sup>BA</sup>	119,4 <sup>BA</sup>	174,9 <sup>CA</sup>	230,6 <sup>BA</sup>	286,3 <sup>BA</sup>	5,7
	Prefloração	63,1 <sup>BA</sup>	118,8 <sup>BA</sup>	174,6 <sup>CA</sup>	230,4 <sup>BA</sup>	286,3 <sup>BA</sup>	
PB	Emborrachamento	166,1 <sup>CA</sup>	156,3 <sup>BCA</sup>	146,5 <sup>ABC</sup>	136,7 <sup>AB</sup>	126,6 <sup>A</sup>	7,4
	Prefloração	117,2 <sup>AB</sup>	119,7 <sup>AB</sup>	122,1 <sup>AB</sup>	124,5 <sup>A</sup>	126,6 <sup>A</sup>	

Medias seguida de letras minúsculas distintas diferem na comparação entre colunas (Níveis de substituição) e medias seguida de letras maiúsculas distintas diferem na comparação entre linhas (Estádio de desenvolvimento) (P<0,05).

Quanto aos parâmetros de fermentação, observou-se maiores (P<0,05) potenciais de produção de gases (A) nos tratamentos com 50% e 75% de inclusão de *T. diversifolia*, tanto para as plantas coletadas no período de emborrachamento quanto para as plantas coletadas no período de prefloração (Tabela 2). Entretanto as maiores (P<0,05) taxas de produção de gases ( $\mu$ ) e tempos de colonização (TC) foram observadas nos tratamentos com baixos níveis de inclusão da *T. diversifolia* (0% e 25%) (Tabela 2). Esse fato pode estar relacionado com a maior concentração de FDN da *B. brizantha* em relação à *T. diversifolia*. Observou-se maior degradabilidade do material nos tratamentos com menores níveis de inclusão de *T. diversifolia*, sendo que até 50% de inclusão a degradabilidade não foi afetada e a partir desse nível de inclusão houve redução na degradabilidade do material (Tabela 2). Esse fato pode estar relacionado com a maior concentração de hemicelulose da *B. brizantha* (286,3 g/Kg MS) em comparação a *T. diversifolia* (63 g/Kg MS). Segundo Van Soest (1994) a hemicelulose é a fração da parede celular que possui mais rápida degradabilidade. Tanto para o tempo de incubação de 6 horas quanto para o tempo de 12 horas as concentrações de acetato não diferiram significativamente (P>0,05). Entretanto, foram observados maiores concentrações de propionato nos tratamentos com 50% de inclusão de *T. diversifolia*. A relação acetato: propionato não variou estatisticamente (P>0,05), porém verificou-se a tendência de inferioridade nos tratamentos com 50% de inclusão de *T. diversifolia*. A mesma tendência foi observada para as produções de metano (Tabela 3).

**Tabela 2.** Potencial máximo de produção de gases (A), taxa de produção de gases ( $\mu$ ), tempo de colonização (TC) e degradabilidade efetiva (DE) da matéria seca da *Tithonia diversifolia* em dois estágios de desenvolvimento e em diferentes níveis de substituição por *Brachiaria brizantha*.

Parâmetros*	Estágios	Níveis de substituição de <i>T. diversifolia</i> por <i>B. brizantha</i>				
		100%	75%	50%	25%	0%
A (mL/g MS)	Emborrachamento	291,8	399,7	399,7	200,5	197,6
	Prefloração	187,2	399,7	224,9	202,5	197,6
$\mu$ (mL/g MS/h)	Emborrachamento	0,002	0,003	0,003	0,023	0,031
	Prefloração	0,008	0,003	0,006	0,024	0,031
L (h)	Emborrachamento	0,001	0,001	0,001	0,002	0,184
	Prefloração	0,001	0,001	0,001	0,001	0,184
DIVMS (g/Kg MS)	Emborrachamento	325,6	394,0	404,9	431,7	449,1
	Prefloração	342,5	379,2	410,2	431,8	449,1

\*Valores estimados pelo modelo de France et al. (1993) tendo como base os dados obtidos pela técnica semiautomática de produção de gases (MAURÍCIO et al., 1999).

**Tabela 3.** Produção de ácidos graxos voláteis (acetato e propionato), relação acetato: propionato (Ac: Pr) e produção de metano (mg/g MS degradada) da *Tithonia diversifolia* em dois estádios de desenvolvimento e em diferentes níveis de substituição por *Brachiaria brizantha*, avaliados nos tempos de incubação de 6 e 12 horas.

Estádio		Níveis de substituição de <i>T. diversifolia</i> por <i>B. brizantha</i>					CV (%)
		0%	25%	50%	75%	100%	
Acetato (6 h)	Emborrachamento	21,7 <sup>aA</sup>	21,8 <sup>aA</sup>	27,0 <sup>aA</sup>	23,3 <sup>aA</sup>	22,3 <sup>aA</sup>	12,2
	Prefloração	22,1 <sup>aA</sup>	22,7 <sup>aA</sup>	25,6 <sup>aA</sup>	23,5 <sup>aA</sup>	22,3 <sup>aA</sup>	
Acetato (12 h)	Emborrachamento	31,6 <sup>aA</sup>	30,2 <sup>aA</sup>	22,5 <sup>aA</sup>	24,2 <sup>aA</sup>	26,5 <sup>aA</sup>	12,2
	Prefloração	29,6 <sup>aA</sup>	27,5 <sup>aA</sup>	22,5 <sup>aA</sup>	22,1 <sup>aA</sup>	26,5 <sup>aA</sup>	
Propionato (6 h)	Emborrachamento	6,9 <sup>aA</sup>	7,2 <sup>abB</sup>	9,5 <sup>aA</sup>	7,5 <sup>abA</sup>	7,8 <sup>abA</sup>	11,5
	Prefloração	6,2 <sup>bB</sup>	7,1 <sup>abA</sup>	8,5 <sup>aA</sup>	6,9 <sup>abA</sup>	7,8 <sup>abA</sup>	
Propionato (12 h)	Emborrachamento	7,1 <sup>aA</sup>	7,5 <sup>aA</sup>	8,0 <sup>aA</sup>	7,3 <sup>aA</sup>	6,9 <sup>aA</sup>	11,5
	Prefloração	7,0 <sup>aA</sup>	6,6 <sup>aA</sup>	8,0 <sup>aA</sup>	6,7 <sup>aA</sup>	7,7 <sup>aA</sup>	
Ac: Pr (6 h)	Emborrachamento	3,1 <sup>aA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	2,8 <sup>aA</sup>	3,1 <sup>aA</sup>	2,9 <sup>aA</sup>	14,2
	Prefloração	3,6 <sup>aA</sup>	3,6 <sup>aA</sup>	2,6 <sup>aA</sup>	3,4 <sup>aA</sup>	2,9 <sup>aA</sup>	
Ac: Pr (12 h)	Emborrachamento	4,6 <sup>aA</sup>	4,0 <sup>abA</sup>	2,8 <sup>aA</sup>	3,3 <sup>abA</sup>	3,9 <sup>abA</sup>	14,2
	Prefloração	4,2 <sup>aA</sup>	4,2 <sup>abA</sup>	2,8 <sup>aA</sup>	3,3 <sup>abA</sup>	3,5 <sup>abA</sup>	
Metano (6 h)	Emborrachamento	6,1 <sup>aA</sup>	8,1 <sup>aA</sup>	3,2 <sup>aA</sup>	5,4 <sup>aA</sup>	6,9 <sup>aA</sup>	30,4
	Prefloração	7,0 <sup>aA</sup>	4,3 <sup>aA</sup>	5,2 <sup>aA</sup>	6,4 <sup>aA</sup>	6,9 <sup>aA</sup>	
Metano (12 h)	Emborrachamento	5,0 <sup>abA</sup>	6,4 <sup>abA</sup>	3,0 <sup>aA</sup>	8,6 <sup>aA</sup>	8,2 <sup>abA</sup>	30,4
	Prefloração	9,8 <sup>aA</sup>	7,6 <sup>aA</sup>	6,8 <sup>aA</sup>	7,6 <sup>aA</sup>	8,2 <sup>aA</sup>	

Medias seguida de letras minúsculas distintas diferem entre colunas (Níveis de substituição) e medias seguida de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na comparação entre linhas (Estádio de desenvolvimento) (P<0,05).

## Conclusões

O envelhecimento da planta *T. diversifolia* causa redução significativa nos teores de PB. O nível de inclusão de 50% de, nas condições desse experimento, foi o que apresentou os melhores resultados. A associação de *T. diversifolia* à *B. Brizantha* não reduziu a emissão de metano.

## Agradecimentos

Embrapa/CNPq – Edital Repensa, Fapemig e DEPEB/UFSJ

## Literatura Citada

FRANCE, J.; DHANOA, M.S.; THEODOROU, M.K. et al. A model to interpret gas accumulation profiles associated with in vitro degradation of ruminant feeds. **J. Theor. Biol.**, v.163, p.99-111, 1993

MAURICIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated in vitro gas production technique for ruminants feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.

PEDREIRA, S.M.; PRIMAVESI, O. **Impacto da produção animal sobre o ambiente**. IN: BERCHIELLI, T.T.; PIRES, A.V.; OLIVEIRA, S.G. (Eds.) **Nutrição de ruminantes**. 1.ed. Jaboticabal: Funep, 2006. p.497-511.

RODRIGUES R. C.; LIMA D. O. S.; CABRAL L. S. et al. Produção e morfofisiologia do capim *Brachiaria brizantha* cv. xaraés sob doses de nitrogênio e fósforo. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v.2, n.1., p.124-131, 2012.

VAN SOEST, P.J. **Nutritional ecology of the ruminant**. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.



# Variabilidade genética de clones de *Brachiaria ruziziensis* para a resistência à *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera:Cercopidae)

Alexander Machado Auad<sup>1</sup>, Tiago Teixeira Resende<sup>1</sup>, Natália de Andrade Teixeira Fernandes<sup>1</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>1</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** Objetivou-se selecionar clones de *Brachiaria ruziziensis* resistentes à cigarrinha-das-pastagens *M. spectabilis*. Para isso, seis ovos em estágio próximo à eclosão foram depositados em cada um dos 37 clones de *B. ruziziensis*, além da testemunha *B. decumbens* (suscetível). Utilizou-se delineamento de blocos ao acaso, com 6 repetições. Os materiais testados exibiram diferenças significativas para a sobrevivência ninfal, que variou de 11% a 83%. Dos clones testados 18,9% mostraram resistência a *M. spectabilis* (JAG2010-33; JAG2010-67; JAG2010-38; JAG2010-15; JAG2010-03; JAG2010-27 e JAG2010-40), exibindo sobrevivência ninfal inferior a 30%. Esses seguirão no programa de melhoramento de braquiária.

**Palavras-chave:** braquiária, cigarrinhas-das-pastagens, forrageiras, resistência de plantas.

**Abstract:** The aim of this study was to select *Brachiaria ruziziensis* clones resistant to spittlebug, *M. spectabilis*. We evaluated the nymphal survival this specie in 37 clones of *B. ruziziensis*. These clones were maintained in creation unit with six eggs of insect pest. We used arranged in a completely randomized block design, with six replications. The analysis of variance identified significant differences for nymph survival, which ranged from 11 to 83%. In the clones tested, 18.9% showed resistant to *M. spectabilis* (JAG2010-33; JAG2010-67; JAG2010-38; JAG2010-15; JAG2010-03; JAG2010-27 e JAG2010-40), exhibiting nymphal survival below 30%. These will be selected to continue the *B. ruziziensis* breeding program.

**Keywords:** signal grass, spittlebugs, forage, plant resistance.

## Introdução

As gramíneas do gênero *Brachiaria* possuem alto valor nutricional e boa aceitação pelo gado, em função da sua boa palatabilidade, e consequentemente são de grande importância na alimentação dos bovinos. Apesar dessas vantagens, exibem elevado grau de susceptibilidade às cigarrinhas-das-pastagens, as quais causam grandes danos comprometendo a oferta de forragem para os animais (AUAD et al., 2007)

A estratégia do uso de plantas resistentes tem sido uma das alternativas promissora no controle das cigarrinhas das pastagens, uma vez que o controle químico dessa praga é ecologicamente e economicamente inviável. A seleção de clones de *B. ruziziensis* por antibiose possibilita discernir genótipos resistentes ao inseto praga (MILES, 2006). Neste sentido, o objetivo deste trabalho foi selecionar clones de *B. ruziziensis* resistentes à cigarrinha-das-pastagens, *M. spectabilis*.

## Material e Métodos

Adultos de *M. spectabilis*, provenientes no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado em Valença-RJ, foram transferidos para o Laboratório de Entomologia, sexados e acondicionados em gaiolas com uma planta de *B. ruziziensis*. O substrato para oviposição foi composto por gaze umedecida em água destilada, que foi depositada na base da gaiola. Os ovos obtidos foram transferidos para placas de Petri de cinco centímetros de diâmetro, revestidas com papel filtro e acondicionados em câmara climatizada ( $25 \pm 2$  °C, 12 horas de fotofase e  $70 \pm 10\%$  de umidade relativa) até o estágio próximo a eclosão das ninfas.

As plantas foram cultivadas em vasos contendo 500 mL de substrato durante 60 dias. Para facilitar a alimentação das ninfas, as raízes superficiais das plantas foram expostas, e cada planta foi infestada com seis ovos de *M. spectabilis* próximos ao estágio de eclosão. Na sequência os vasos foram tampados, para impedir a fuga do inseto praga. As plantas foram mantidas em casa de vegetação, e 40 dias após a deposição dos ovos foi realizada a contagem das ninfas sobreviventes entre o terceiro a quinto instares, em 37 clones de *B. ruziziensis*, além da testemunha suscetível, *B. decumbens*.

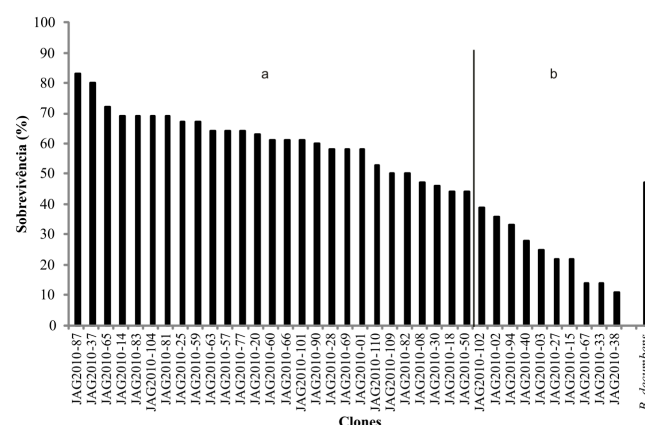
Utilizou-se delineamento experimental em blocos inteiramente casualizado com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias da porcentagem de sobrevivência comparadas pelo teste de Scott & Knott, a 5% de probabilidade, utilizando o programa Sisvar® versão 5.1.

## Resultados e Discussão

Por meio da análise de variância identificou-se diferença significativa entre os clones, no que se refere à porcentagem de sobrevivência ninfal de terceiro a quinto instar de *M. spectabilis* (Figura 1). Isso demonstra a existência de variabilidade genética entre os clones de *B. ruziziensis* para a resistência a este inseto praga. Clones de *B. ruziziensis* resistentes as cigarrinhas das pastagens também foram relatados por Auad et al. (2007) e Souza Sobrinho et al. (2010) reforçando a existência de variabilidade genética dentro dessa espécie de forrageira quanto a resistência a esses insetos-praga.

A porcentagem média de sobrevivência ninfal de *M. spectabilis* obtidas nos clones de *B. ruziziensis* foram separados em dois grupos distintos pelo teste de Scott-Knott. Os grupos com as menores médias de sobrevivência foi formado por dez clones (JAG2010-33; JAG2010-67; JAG2010-38; JAG2010-15; JAG2010-03; JAG2010-27; JAG2010-40; JAG2010-94; JAG2010-02, JAG2010-102) e estes genótipos não ultrapassaram 38,8% de sobrevivência. Já o outro grupo, formado por 27 clones apresentaram maior susceptibilidade a este inseto, com variação entre 44 a 83% de sobrevivência ninfal. A testemunha *B. decumbens* apresentou comportamento semelhante aos clones susceptíveis.

De acordo com a Cardona et al. (1999), apenas genótipos com a sobrevivência das ninfas abaixo de 30% são considerados resistentes a pragas de insetos. De acordo com este padrão, os clones JAG2010-33; JAG2010-67; JAG2010-38; JAG2010-15; JAG2010-03; JAG2010-27 e JAG2010-40 podem ser considerados resistentes a *M. spectabilis*. Esses resultados sugerem que os clones devam ser incluídos como progenitores nos novos ciclos de cruzamentos de *B. ruziziensis* no programa de melhoramento genético. A combinação desta característica, com rendimentos mais elevados e qualidade da forragem tornarão esses genótipos mais atraentes para os agricultores, com potenciais ganhos na produção animal (SOUZA SOBRINTO et al., 2010).



**Figura 1.** Sobrevivência ninfal média de *M. spectabilis* em clones de *B. ruziziensis* oriundos da população "JAG2010" selecionadas do intercruzamento de progênies com base em características de quantidade e qualidade da forragem.

Médias seguidas de letras distintas diferiram entre si pelo teste de Scott Knott ( $p < 0,05$ ).

## Conclusões

Os clones JAG2010-33; JAG2010-67; JAG2010-38; JAG2010-15; JAG2010-03; JAG2010-27 e JAG2010-40 por terem sido resistentes à *Mahanarva spectabilis*, seguiram nos novos ciclos de cruzamento do programa melhoramento genético de forrageiras.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig e a Associação para o Fomento à Pesquisa de Melhoramento de Forrageiras Tropicais – Unipasto pelo suporte financeiro a esta pesquisa.

## Literatura citada

AUAD, A.M.; SIMÕES, A.D.; PEREIRA, A.V. et al. Seleção de genótipos de capim-elefante quanto à resistência à cigarrinha-das-pastagens. **Pesquisa agropecuária Brasileira**, v.42, p.1077-1081, 2007.

CARDONA, C., MILES, J.W., SOTELO, G. An Improved Methodology for massive screening of *Brachiaria* spp. Genotypes for resistance to *Aeneolamia varia* (Homoptera: Cercopidae). **Journal of Economic Entomology**, v.92, n.2, p.490-496, 1999.

MILES JW, CARDONA C, SOTELO G. Recurrent selection in a synthetic brachiariagrass population improves resistance to three spittlebug species. **Crop Science** v.46, p.1088-1093, 2006.

SOUZA SOBRINHO, F., AUAD, A. M., LÉDO, F. J. S. Genetic variability in *Brachiaria ruziziensis* for resistance to spittlebugs. **Crop Breeding and Applied Biotechnology**, v.10, p.83-88, 2010.

# **Polimorfismos genéticos nos genes da beta-lactoglobulina e kappa-caseína em bovinos selecionados para produção de leite<sup>1</sup>**

## **Genetic polymorphisms of beta-lactoglobulin and kappacasein genes in bovines selected for milk production**

Lorena Evangelista Fernandes<sup>2</sup>, Sabine Wohlfres Viana<sup>3</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis<sup>4</sup>, Rui da Silva Verneque<sup>5</sup>, Marco Antonio Machado<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Parte integrante do Programa Nacional de Melhoramento do Zebu Leiteiro, financiado pela Embrapa.

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas – CES/JF. Bolsista do CNPq. e-mail: lorenafernandes2@gmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: binewjf@hotmail.com

<sup>4</sup> Embrapa Gado de Leite. e-mail: danielle.reis@embrapa.br

<sup>5</sup> Embrapa Gado de Leite. e-mail: rui.verneque@embrapa.br

<sup>6</sup> Embrapa Gado de Leite. e-mail: marco.machado@embrapa.br

**Resumo:** Os polimorfismos genéticos da beta-lactoglobulina e da kappa-caseína bovinas estão associados à produção, qualidade e características de processamento do leite utilizado na indústria. Este estudo descreve os resultados obtidos a partir da análise das frequências dos genótipos de beta-lactoglobulina (AA, AB e BB) e kappa-caseína (AA, AB e BB) em touros das raças Gir Leiteiro (n=86) e Guzerá (n=5) selecionados para a produção de leite. O DNA dos indivíduos foi extraído, quantificado e armazenado para posterior utilização na *Polymerase chain reaction* (PCR). A técnica de amplificação utilizada foi a de PCR *Restriction fragment length polymorphism* (PCR-RFLP) e os resultados foram obtidos a partir da análise da imagem dos fragmentos em gel de poliacrilamida (8%). No total dos animais testados para beta-lactoglobulina, a frequência dos genótipos foi de 28% (AA), 43% (AB) e 29% (BB) nos touros Gir e de 0% (AA), 40% (AB) e 60% (BB) para os touros Guzerá. Para kappa-caseína a frequência dos genótipos foi de 79% (AA), 21% (AB) e 0% (BB) para touros Gir e de 80% (AA), 0% (AB) e 20% (BB) para touros Guzerá. As variantes genéticas da beta-lactoglobulina e da kappa-caseína podem ser usadas como marcadores na seleção para a produtividade leiteira nas raças estudadas.

**Palavras-chave:** caseína, gir, guzerá, marcadores moleculares, melhoramento genético.

**Abstract:** The polymorphisms of bovine beta-lactoglobulin and kappa-casein genes are associated to production, quality and milk processing traits used in the milk industry. This work reports the results of genotypic frequencies of beta-lactoglobulin (AA, AB and BB) and kappa-casein (AA, AB and BB) genes in Gyr (n=86) and Guzerat (n=5) bulls selected for milk production. The DNA was extracted, quantified and stored until its use in PCR. The technique used for amplification was PCR-RFLP and the identification of genotypes was obtained by the analysis of the fragments separated on 8% native polyacrylamide gel. The frequencies of beta-lactoglobulin genotypes were 27,9% (AA), 43,03% (AB), 29,06% (BB) in Gir animals and 0% (AA), 40% (AB), 60% (BB) in Guzerat animals. The frequency of kappa-casein genotypes were 79,07% (AA), 20,93% (AB), 0% (BB) for Gyr animals and 80% (AA), 0% (AB), 20% (BB) for Guzerat animals. The genetic variants of beta-lactoglobulin and kappa-casein genes may be used as markers in selection for milk productivity in the Gyr and Guzerat breeds.

**Keywords:** beta-lactoglobulin, casein, gyr, guzerat, kappacasein, molecular markers.

## **Introdução**

O Programa Nacional de Melhoramento Genético do Zebu, coordenado pela Embrapa, visa promover o melhoramento genético de rebanhos zebuínos, por meio da identificação e

seleção de animais com genótipos superiores. A eficiência desse Programa pode ser evidenciada pelo incremento da média genética nos grupos testados nos últimos anos (VERNEQUE et al., 2013).

Estudos moleculares identificaram variantes genéticas relacionadas à produção das proteínas presentes no leite. As proteínas do leite mais envolvidas na formação do queijo são as caseínas e as globulinas. As variantes genéticas dessas proteínas tem sido estudadas a fim de associá-las a fatores como o desempenho na lactação, a composição do leite e a eficiência da produção de queijo (BUCHBERGER, 1995). Tais variações podem ser importantes marcadores genéticos para critérios de seleção e cruzamentos de gado leiteiro.

As caseínas são proteínas do leite secretadas por células da glândula mamária e constituem cerca de 80% das proteínas presentes no leite de bovinos. Dentre estas, podemos destacar a kappa-caseína, que constitui aproximadamente 12% da caseína total presente no leite bovino. Considerando estrutura e função, a kappa-caseína é consideravelmente diferente de outras caseínas atuando como um fator estabilizante na formação da estrutura das micelas durante a coagulação do leite. Diversas variantes genéticas da kappa-caseína já foram encontradas, sendo A e B as mais frequentes. Tais variantes diferem nos aminoácidos 136 e 148 (ALEXANDER et al., 1988).

No leite, as globulinas são proteínas globulares envolvidas no processo de coagulação. A beta-lactoglobulina é a proteína encontrada em maior concentração no leite bovino, representando cerca de 12% do total de proteínas. Dentre as cinco variantes genéticas deste gene, em bovinos, as formas A e B são as mais frequentes. Essa proteína apresenta uma molécula com 162 aminoácidos e as variantes A e B diferem nas posições 64 e 118 (FOX & MCSWENEY, 2003).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a frequência genotípica (AA, AB e BB) da beta-lactoglobulina e da kappa-caseína em bovinos das raças Gir Leiteiro e Guzerá para buscar verificar a validade da inclusão dos dados nos Programas Nacionais de Melhoramento Genético, coordenados pela Embrapa Gado de Leite.

## Material e Métodos

O DNA de 91 touros foi extraído a partir de amostras de sangue ou sêmen utilizando um protocolo adaptado das técnicas de Sambrook e Russel (2001). Dentre os animais testados, 86 eram touros da raça Gir Leiteiro e 5 da raça Guzerá. A qualidade do DNA extraído foi verificada utilizando espectrofotômetro (NanoDrop ND-1000) e, a partir dos dados obtidos, foram feitos cálculos de diluição a fim de padronizar a concentração de DNA nas amostras para 20 ng/ $\mu$ L.

A técnica de PCR foi empregada para amplificar o gene da beta-lactoglobulina utilizando os primers *forward* 5' – TGTGCTGGACAGCGACTACAAAAAG – 3' e *reverse* 5' – GCTCCCGGTATATGACCACCCTCT – 3'. O material amplificado foi submetido à ação da enzima de restrição Hae III. Os padrões de restrição variaram de acordo com a Tabela 1. O resultado foi obtido a partir da análise da imagem dos fragmentos obtida por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% corados com solução de nitrato de prata.

**Tabela 1.** Beta-lactoglobulina: padrão dos tamanhos de fragmentos do DNA após digestão com enzima Hae III, utilizando técnica de PCR-RFLP.

Genótipo	Tamanho dos fragmentos (pb)		
AA	-	99	148
AB	74	99	-
BB	74	99	148

pb = pares de base

A amplificação do gene da kappa-caseína foi realizada de acordo com a descrição de Barroso et al. (2008). Os primers utilizados foram CASK-F: 5' – TGTGCTGAGTAGGTATCCTAGTTATGG – 3' e CASK-R: 5' – GCGTTGTCTTCTTTGATGTCTCCTTAG-3'. A digestão enzimática foi realizada com a enzima Hinf I. A partir da imagem dos fragmentos obtida por eletroforese em gel de poliacrilamida

(8%) corado com solução de nitrato de prata, foi feita a interpretação dos resultados, de acordo com o padrão de fragmentação (Tabela 2).

**Tabela 2.** Kappa-caseína: padrão dos tamanhos de fragmentos de DNA após digestão com enzima Hinf I utilizando técnica de PCR-RFLP.

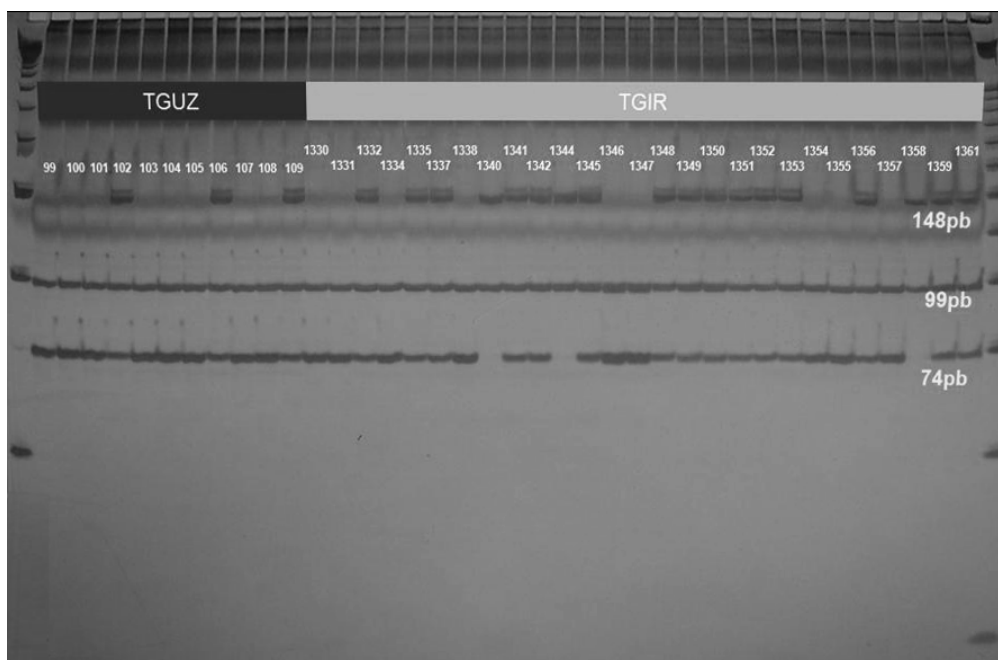
Genótipo		Tamanho dos fragmentos (pb)		
AA	-	326	100	27
AB	426	326	100	27
BB	426	-	-	27

pb = pares de base

## Resultados e Discussão

No total, foram extraídas e armazenadas amostras de DNA de 91 animais, para posterior incorporação ao Banco de Dados de Bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite.

A interpretação dos resultados foi realizada a partir da análise da imagem dos fragmentos, obtida por eletroforese. As genotipagens foram feitas para os alelos AA, AB e BB para beta-lactoglobulina (Figura 1). A frequência dos genótipos obtidos para beta-lactoglobulina está representada na Tabela 3.

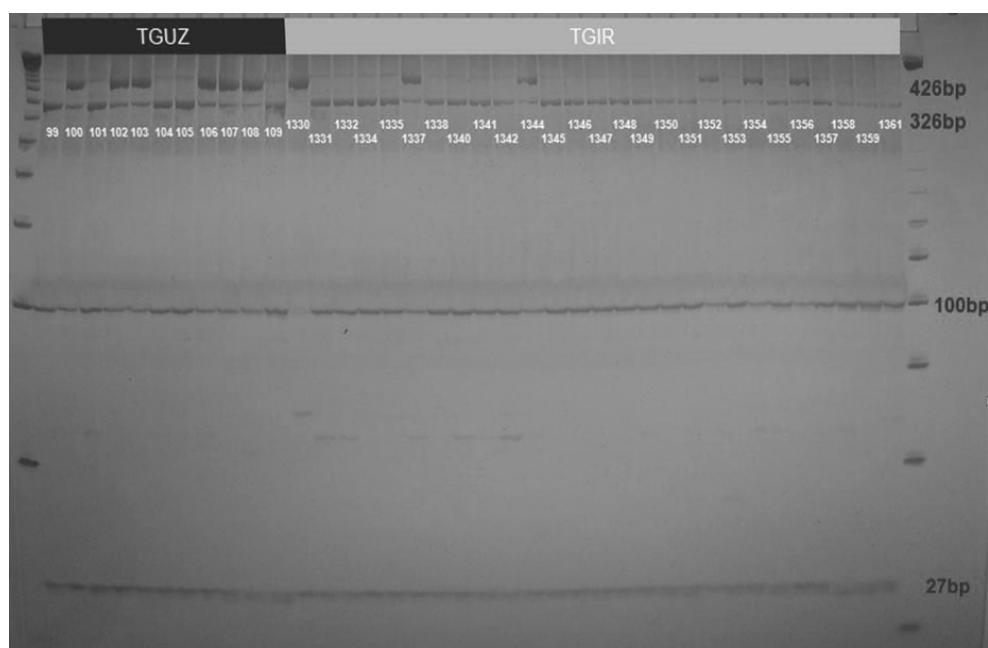


**Figura 1.** Gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata, revelado por eletroforese após PCR-RFLP utilizando a enzima Hae III, mostrando polimorfismos para o gene da beta-lactoglobulina. Pares de base – pb; Marcador de peso molecular de 25 pb; TGUZ – touros guzerá; TGIR – touros gir.

**Tabela 3.** Frequência dos genótipos para beta-lactoglobulina.

Genótipo	Beta-lactoglobulina	
	Gir Leiteiro	Guzerá
AA	27,9%	0%
AB	43,03%	40%
BB	29,06%	60%

A interpretação dos resultados das genotipagens para kappa-caseína foi realizada a partir da análise da imagem dos fragmentos, obtida por eletroforese (Figura 2). As genotipagens foram feitas para os alelos AA, AB e BB (Tabela 4).



**Figura 2.** Gel de poliacrilamida a 8% corado com nitrato de prata, revelado por eletroforese após PCR-RFLP utilizando a enzima Hinf I, mostrando polimorfismos para o gene da kappa caseína. Pares de base – pb; Marcador de peso molecular de 25 pb; TGUZ – touros Guzerá; TGIR – touros Gir.

**Tabela 4.** Frequência dos genótipos para kappa-caseína.

Genótipo	Kappa-caseína	
	Gir Leiteiro	Guzerá
AA	79,07%	80%
AB	20,93%	0%
BB	0%	20%

A crescente demanda industrial por determinadas características do leite deve ter grande impacto nas estratégias de melhoramento genético envolvendo bovinos de leite no Brasil.

Devido aos efeitos dos polimorfismos genéticos de kappa-caseína no rendimento do queijo, a seleção de animais com genótipos favoráveis a essa indústria deve ser considerada. Como existe uma baixa frequência desse alelo (BB) nas raças estudadas, a seleção dirigida por marcadores moleculares pode impactar positivamente a produção leiteira voltada à indústria do queijo.

### Conclusões

Após a avaliação da frequência dos genótipos AA, AB e BB para betalactoglobulina e kappa-caseína em bovinos das raças Gir Leiteiro e Guzerá os resultados obtidos permitiram a inclusão dos animais testados no Sumário de touros do Programa Nacional de Melhoramento Genético do Zebu, coordenado pela Embrapa.

### Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão de bolsa e apoio financeiro e à Embrapa Gado de leite.

### Literatura Citada

ALEXANDER, L.J.; STEWART, A.F.; MACKINLAY, A.G.; KAPELINSKAYA, T. V. Isolation and characterization of the bovine kappa-casein gene. **European Journal of Biochemistry**, v. 178, p. 395-401, 1988.

BARROSO, A.; DUNNER, S.; CAÑON, J. Detection of bovine kappa-casein variants A, B, C and E by means of polymerase chain reaction single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP). **Journal of Animal Science**, v. 76, p. 1535-1538, 1998.

BUCHBERGER, J. Genetics polymorphisms of milk protein: differences between breeds. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v. 304, p. 5-6, 1995.

FOX, P.F.; McSWEENEY, P.L.H. **Advanced dairy chemistry: proteins**. 3 ed. New York: Kluwer Academic, v. 1, 740 p, 2003.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A laboratory Manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2344 p., 2001.

VERNEQUE, R.S.; PANETTO, J.C.C.; PEIXOTO, M.G.C.D; BRUNELI, F.A.T.; SANTOS, G.G.; MACHADO, M. A.; MARTINS, M.F.; SILVA, M.V.G.B.; ARBEX, W.A.; REIS, D.R.L; GERALDO, C.C.; MACHADO, C.H.C.; PEREIRA, M.A.; FILHO, A.E.V.; MACIEL, R.S.; FERNANDES, A.R. **Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro** - Sumário Brasileiro de Touros - Resultado do Teste de Progênie - Maio 2013. Embrapa, Juiz de Fora, Minas Gerais, 2013. (Documentos, 162).



# **Evolução da raça Sindi no Brasil e sua diversidade genética**

Letícia Mendonça Pinto<sup>1</sup>, Taísa Nascimento de Souza<sup>1</sup>, Rui da Silva Verneque <sup>2</sup>, João Cláudio do Carmo Panetto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Gado de Leite – email: leticia\_mendonca\_@hotmail.com, taisasouza\_@hotmail.com

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite – e-mail: rui.verneque@embrapa.br, joao.panetto@embrapa.br

**Resumo:** A raça Sindi é originária do Paquistão, onde se destaca pela rusticidade, docilidade e alta termotolerância. No Brasil, os animais encontram-se distribuídos principalmente nas regiões Nordeste e Sudeste, com pequeno tamanho populacional e amplas probabilidades de alto coeficiente de endogamia entre os animais nos criatórios. A endogamia e o tamanho efetivo são definidos como a probabilidade de um indivíduo apresentar alelos idênticos por descendência. O objetivo deste trabalho foi descrever a evolução e o estado atual da variabilidade genética da raça Sindi no Brasil, por meio de seus coeficientes de endogamia e tamanho efetivo. Foram utilizados registros de nascimento de 18.808 animais constantes do banco de dados da ABCZ. Foi possível observar o aumento acelerado da endogamia até o ano 2000, resultando em uma diminuição do tamanho efetivo da raça Sindi, e um forte gargalo populacional. Depois disso houve uma queda favorável na endogamia até os dias atuais, que não elimina a preocupação com a diversidade genética da raça, mas acena para uma possibilidade de recuperação, caso sejam tomadas as decisões adequadas daqui em diante.

**Palavras-chave:** endogamia, Sindi, tamanho efetivo populacional.

**Abstract:** The Sindi breed is originally from Pakistan, where it shows good adaptation to the environment, docility and good thermotolerance. In Brazil, the animals are distributed mainly in the Northeast and Southeast regions, with small population size and probabilities of large high coefficient of inbreeding among the animals on the farms. Inbreeding and effective population size is defined as the probability that an individual has alleles identical by descent. The aim of this study was to describe the evolution and current state of the genetic diversity of the Sindi breed in Brazil, using their inbreeding coefficients and effective size. We used birth records of 18,808 animals listed in the database ABCZ. It was possible to observe a rapid increase of inbreeding until the year 2000, resulting in a decrease in the effective population size of the Sindi, and a strong population bottleneck. After that moment there was a favorable decrease in inbreeding until 2010, it does not eliminate the concern about the genetic diversity of the breed, but nods to the possibility of recovery if the right decisions are taken hereafter.

**Keywords:** effective population size, inbreeding, Sindi.

## **Introdução**

Diante do bom desempenho das raças zebuínas no Brasil, ao final do último século, foram implantados no país programas de melhoramento genético. Estes programas têm buscado a ampliação da acurácia das avaliações genéticas, de modo a permitir a continuidade e aumento do progresso genético alcançado. No entanto, diante do expressivo efeito fundador quando da introdução da raça no país (FARIA et al., 2001, FARIA et al., 2004), das perdas populacionais nos recorrentes gargalos e da prática intensa de endogamia como ferramenta de seleção dentro e entre rebanhos, a preocupação com a perda de variabilidade genética tornou-se uma tônica.

A raça Sindi chegou ao Brasil através de importações comerciais ocorridas oficialmente no ano de 1952, na qual foram distribuídos em algumas partes do país, mas atualmente, seu rebanho se concentra, em grande maioria, na região do Nordeste, com alguns rebanhos na região Sudeste. Essa concentração na região se deve ao fato da boa adaptação desses animais em ambientes hostis, devido sua característica promissora de rusticidade. Além disso, os animais da raça Sindi apresentam comportamento dócil, um bom rendimento produtivo e uma alta eficiência

alimentar e reprodutiva. Porém, alguns estudos têm mostrado um pequeno tamanho efetivo de população e, conseqüentemente, um elevado aumento na taxa de endogamia na raça.

As pesquisas com os animais da raça Sindi ainda se encontram em período inicial, mas tem-se notado o aumento do interesse tanto por parte dos pesquisadores quanto pelos produtores rurais. Mesmo assim, o rebanho Sindi necessita de programas que visem sua expansão, devido sua manutenção em poucos rebanhos.

O objetivo deste trabalho foi descrever a evolução e o estado atual da variabilidade genética da raça Sindi no Brasil, por meio de seus coeficientes de endogamia e tamanho efetivo.

## Material e Métodos

Foram utilizados registros de nascimento de 18.808 animais constantes do banco de dados da ABCZ, incluindo as identificações dos animais, pais e mães, quando presentes, além de datas de nascimento e sexo. Os nascimentos ocorreram entre os anos de 1955 e 2010.

### Endogamia e tamanho efetivo

Definida como a probabilidade de um indivíduo apresentar alelos idênticos por descendência, os coeficientes de endogamia ( $F_t$ ) foram calculados seguindo Meuwissen e Luo (1992). O aumento da endogamia ( $\Delta F$ ) foi calculado para cada geração por meio da fórmula:  $\Delta F = F_t - F_{t-1}$ , onde  $F_t$  (geração atual) e  $F_{t-1}$  (geração anterior) são as médias dos coeficientes de endogamia para cada uma das gerações.

O tamanho efetivo da população ( $N_e$ ), definido como o número de animais em reprodução que levaria ao mesmo nível de endogamia da população atual, se contribuíssem igualmente para a próxima geração, foi calculado usando-se o resultado do  $\Delta F$  através da fórmula  $N_e = 1/\Delta F$ , para cada geração que tiver  $F_t > F_{t-1}$ .

Segundo Goyache et al. (2003), apud Mariz (2010), em populações pequenas e com pouca profundidade nas informações de pedigree, seja qual for o método utilizado para calcular o tamanho efetivo, este parâmetro superestima o real tamanho efetivo da população.

Para melhor caracterizar essa situação, foram utilizados três valores adicionais para o tamanho efetivo, disponíveis no programa ENDOG, pelo cálculo de coeficientes de regressão ( $b$ ) da endogamia individual sobre diferentes números gerações considerados no cálculo: i – número de gerações completas; ii – número máximo de gerações; e iii – número equivalente de gerações completas), e considerando o resultado do respectivo coeficiente de regressão, como o aumento da endogamia entre duas gerações ( $F_t - F_{t-1} = b$ ), e conseqüentemente,  $N_e = 1/b$ .

Quando as informações para a avaliação são escassas, estas estimativas podem ser úteis para informar os limites mínimo (i), máximo (ii) e “real” (iii) na população analisada.

O cálculo do aumento da endogamia foi dado pela fórmula:  $\Delta F = F_t - F_{t-1} \sim b(1 - F_t)$ , sendo  $F_t$  a média dos coeficientes de endogamia da subpopulação referência e  $b$  o coeficiente de regressão individual de endogamia sobre o número equivalente de gerações completas. Segundo Gutiérrez et al., 2003, o tamanho efetivo pode ser estimado através do coeficiente de regressão ( $b$ ), do coeficiente final de endogamia e o ano de nascimento em uma população referência. Calculou-se então, o aumento da endogamia entre duas gerações como  $F_t - F_{t-1} = 1/x$ , onde  $1/x$  é o tamanho médio do intervalo de gerações e  $F_t$  a média dos coeficientes de endogamia na população referência.

### Aumento individual da endogamia e tamanho efetivo realizado

As taxas de aumento individual da endogamia ( $\Delta F_i$ ) foram calculadas pela fórmula  $\Delta F_i = 1 - F_t$ , onde  $F_t$  representa o coeficiente individual de endogamia e  $t$  representa o número equivalente de gerações completas no pedigree de cada indivíduo. Um estimativa alternativa do tamanho efetivo da população, chamada de tamanho efetivo realizado ( $N_e$ ) por Cervantes et al. (2008), foi calculada através da média das taxas de aumento individual de endogamia ( $\Delta F$ ) na população referência, como  $N_e = 1/\Delta F$ . Observe que esta forma de calcular o tamanho efetivo de populações não depende, no todo, das formas de acasalamento da população referência, mas dos acasalamentos realizados ao longo do tempo na genealogia de cada animal. O erro padrão do tamanho efetivo populacional realizado foi calculado a partir do desvio padrão de  $\Delta F$  e da raiz quadrada do tamanho da população referência ( $n$ ) com a seguinte forma:  $\sigma N_e = 2N_e \sigma \Delta F$ . Os valores das taxas de aumento individual de endogamia e do tamanho efetivo populacional realizado foram calculados com o uso do programa Endog. Para a estimativa do  $N_e$ , foram considerados na população referência, os animais da geração mais recente, com o total de

8.821 animais nascidos nos últimos oito anos, partir de janeiro de 2002 até Fevereiro de 2010, todos eles com pais e mães conhecidos.

A partir das médias anuais das taxas de aumento individual de endogamia ( $\Delta Fi$ ) e das médias anuais de números equivalentes de gerações completas, foram calculadas médias anuais de equivalentes de endogamia ( $EqF$ ), para fins de comparação com os coeficientes tradicionais de endogamia, cômoda seguinte forma:  $EqF = 1 - (1 - \Delta Fi)^t - 1$ , em que  $\Delta Fi$  representa as médias anuais das taxas de aumento individual de endogamia e  $t$  representa as médias anuais de números equivalentes de gerações completas.

#### **Conhecimento de genealogia e profundidade de pedigree**

Para cada indivíduo foram calculados o número de gerações completas encontradas, o número máximo de gerações encontradas e o número equivalente de gerações completas encontradas para cada animal nos dados da genealogia.

O primeiro é definido como o número de gerações que separa a prole da geração completa mais distante no seu pedigree, onde 2 g ancestrais do indivíduo são conhecidos. Ancestrais com pais conhecidos são considerados fundadores (geração 0). O segundo é o número de gerações separando os indivíduos de seu antepassado mais distante. Já o equivalente de gerações completas encontradas é calculado a partir da soma de todos os antepassados conhecidos, sendo calculadas com a soma de  $(1/2)^n$ , onde  $n$  é o número de gerações que separa o indivíduo de cada ancestral conhecido (Maignel et al, 1996).

## **Resultados e Discussão**

Os registros genealógicos da raça Sindi na Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ) apresentaram crescimento consistente ao longo do tempo, desde seu início com as importações da década de 50, e especialmente a partir dos anos 80 até os dias atuais.

A média observada para os coeficientes de endogamia foi de 4,6%, entre os 18.808 animais analisados, para os parentescos médios individuais, a média foi de 3,13%. Uma descrição da evolução da endogamia e dos parentescos médios na população de acordo com as gerações pode ser observada na Tabela 1. O número máximo de gerações completas identificadas foi de cinco para 28 animais no arquivo.

**Tabela 1.** Dados da média de endogamia por gerações completas.

Geração	Nº de animais	Média dos coef. de endogamia	% de animais endogâmicos	Média dos coef. de endogamia p/os animais endogâmicos	Média dos coef. de parentesco médios
0	2568	----	----	----	0,13%
1	3537	0,29%	2,37%	12,15%	1,86%
2	5050	4,86%	56,50%	8,59%	3,79%
3	6220	7,40%	69,28%	10,69%	4,36%
4	1428	10,13%	92,41%	10,96%	3,98%
5	28	13,21%	100,00%	13,21%	3,92%

Observou-se que a endogamia na raça apresentou um nível de crescimento acentuado no decorrer das gerações, sendo este inclusive maior do que o crescimento nos parentescos médios, o que indica que os acasalamentos aconteceram frequentemente com animais mais aparentados que a média.

No trabalho de Faria et al. (2004), também foram obtidos resultados crescentes nos coeficientes de endogamia, sendo que no ano de 1979 não haviam registros de animais endogâmicos. Porém, com o passar do tempo, a endogamia começou a se manifestar na raça de

forma acelerada, sendo que nos anos de 1996 a 1998, observou-se que quase toda totalidade de animais haviam se tornado endogâmicos, indicando uma forte erosão genética intra-racial.

O coeficiente total de endogamia, no período de 1979 a 1998, passou de 0,38% para 10,13%, refletindo em um aumento de 0,5% ao ano.

A partir dos números médios de gerações nas genealogias dos animais, sejam máximas, completas, ou equivalentes, e das respectivas médias de endogamia estimadas para cada um desses critérios, o tamanho efetivo da população foi calculado de três formas diferentes. Esses resultados são apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Número médio de gerações máximas, completas e equivalentes, e os respectivos resultados de endogamia e tamanho efetivo da população

---

□ Média do número de gerações máximas: 4,56

Média de endogamia por máximo de gerações: 0,79% → Tamanho efetivo populacional: 63,02

□ Média do número de gerações completas: 2,03

Média de endogamia por gerações completas: 2,80% → Tamanho efetivo populacional: 17,84

□ Média do número equivalente de gerações completas: 3,02

Média de endogamia por número equivalente de gerações completas: 1,82% → Tamanho efetivo populacional: 27,42

---

O aumento da endogamia resultou em uma diminuição acentuada do tamanho efetivo populacional. Neste trabalho foi obtido o resultado de tamanho efetivo de 27,42, calculado a partir da média dos números equivalentes de gerações, sendo este muito inferior ao recomendado, o que traz preocupação quanto à manutenção da diversidade genética da raça Sindi. Os valores calculados a partir dos números máximos de gerações, e de gerações completas podem ser considerados como limites máximo e mínimo para a estimativa desse parâmetro na população.

No trabalho de Faria et al. (2001), observou-se que o número efetivo de fêmeas registradas no território brasileiro em reprodução não passava de 1.000 animais, e o tamanho efetivo era 19. Estima-se que atualmente existam cerca de cinco mil fêmeas vivas da raça Sindi registradas no Brasil. Assim, a situação atual da raça ainda é preocupante, mas pode ser considerado que melhorou nos últimos 12 anos.

Ainda no trabalho de Faria et al. (2001) foram registrados 2.260 animais da raça Sindi no Brasil, no período de 1989 a 1998, dos quais 988 eram machos e 1.272 eram fêmeas, sendo que 60% desses animais pertenciam a um único criador. Com esses resultados observa-se que essa raça está presente em apenas poucos rebanhos, confirmando ainda mais o seu risco de desaparecimento.

O tamanho efetivo realizado ( $N_e$ ) da população, calculado a partir das taxas de aumento individual da endogamia, para uma população referência de 8.821 animais, foi de 30,92, com erro padrão de 7,39. Essa estimativa foi próxima àquela estimada a partir do número equivalente de gerações, para a população como um todo.

Para obtenção desses resultados foi preciso analisar várias gerações nas genealogias dos indivíduos. Porém, não é tão simples obter todas as genealogias dos animais em estudo, principalmente as mais antigas. Essa falta de profundidade no conhecimento das genealogias faz com que as estimativas estejam sujeitas a variações, como pode-se verificar pelo elevado valor do erro-padrão da estimativa.

Quando poucos animais são pais de muitos descendentes ocorre uma diminuição no tamanho efetivo da raça e um aumento na taxa de endogamia, sendo esses dois parâmetros inversamente proporcionais.

Alguns autores indicam o tamanho efetivo populacional mínimo para esses animais. No trabalho de Nicholas (1980), apud Faria (2004) é proposto o valor mínimo de 50 por geração, para que assim se possa obter retorno econômico na população sob seleção. Desta forma é possível observar que os valores da raça se encontram bem reduzidos, o que faz com que o estabelecimento de um programa de seleção na raça necessite de cuidados especiais quanto ao monitoramento da diversidade genética. Segundo Nicholas (1988), apud Faria (2002), para os

níveis de endogamia não ultrapassarem o recomendado, deve-se, na prática, tentar evitar ao máximo o acasalamento de animais aparentados, além de manter o tamanho efetivo de população suficiente para que os valores da taxa de aumento da endogamia ( $\Delta F$ ) sejam menores que 1% ao ano. Desta forma, é recomendado manter um tamanho efetivo maior que 50/intervalo de gerações. (FARIA et. al, 2002)

A partir do ano 2000, observa-se uma queda nessas médias. Uma possível explicação para isso seria uma maior conscientização dos produtores rurais, devido aos resultados obtidos e divulgados pelos pesquisadores da área. Após um contínuo crescimento no período anterior, houve provavelmente um maior monitoramento com o objetivo de preservar a raça Sindi, dado seu pequeno tamanho efetivo e a manutenção em poucos rebanhos. O aumento da endogamia em uma raça causa o risco da diminuição da diversidade genética e das possibilidades futuras de seleção para melhoria da produtividade.

Um programa de conservação e desenvolvimento de recursos genéticos animais, deve ter como um dos objetivos, a manutenção da diversidade genética das populações que estão sendo trabalhadas.

Faria et al. (2004), também analisando os dados do Serviço de Registros Genealógicos da ABCZ, encontraram altos valores para o coeficiente de consanguinidade e a taxa de crescimento da endogamia na raça Sindi.

Os acasalamentos entre animais aparentados vêm ocorrendo mais frequentemente do que a média esperada, sendo esse resultado notado facilmente ao se comparar as médias ao longo do ano. Em contrapartida, foi observado um declínio no tamanho efetivo populacional, causando preocupação quanto a sua manutenção da diversidade genética da raça. Dos 4.981 animais cadastrados no arquivo genealógico, 1.611 apresentavam coeficiente de endogamia positivo (FARIA et al., 2004).

Vale explicar que parte do aumento observado nas médias dos coeficientes de endogamia, está relacionada com o fato de hoje em dia as genealogias dos animais estarem mais completas e seguras do que antigamente. Desta forma, obtendo-se mais informações a respeito de seus antecessores, seria esperado que ocorresse um aumento dos valores calculados. A diferença observada entre os valores de  $F$  e  $EquF$ , pode ser explicada justamente por essas subestimativas dos coeficientes de endogamia dos animais com pouca profundidade de pedigree, que ficam corrigidas no caso do Equivalente de Endogamia.

Para aquelas populações onde as informações das genealogias não estão disponíveis, uma alternativa para a obtenção dos resultados procurados, seria através das análises de idade, distribuição por sexo e número de macho e fêmeas que estão em reprodução, e assim se realizariam estimativas dos coeficientes de endogamia, tamanho efetivo e intervalos de gerações (BODÓ, 1990).

## **Conclusões**

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, foi possível observar o aumento acelerado da endogamia até o ano 2000, resultando em uma diminuição do tamanho efetivo da raça Sindi, e um forte gargalo populacional. Depois disso houve uma queda favorável na endogamia até os dias atuais, que não elimina a preocupação com a diversidade genética da raça, mas acena para uma possibilidade de recuperação, caso sejam tomadas as precauções adequadas daqui em diante.

Para que uma raça tenha uma evolução genética satisfatória é necessária à utilização de programas de conservação, seleção e melhoramento, no entanto, é necessário também respeitar suas limitações, para que no futuro não tenhamos resultados insatisfatórios.

## **Agradecimentos**

Ao CNPq e à Fapemig pelo apoio financeiro, e à ABCZ pela disponibilização do Banco de dados.

## Literatura Citada

BODÓ, I. **Methods and experiences with in situ preservation of farm animals**. Expert Consultation on FAO Programmes for the preservation of animal genetic resources, 1990.

FARIA, F.J.C.; VERCESI FILHO, A.E.; MADALENA, F.E. et al. Parâmetros populacionais do Rebanho Sindi registrado no Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30(6S), 2001.

FARIA, F.J.C.; VERCESI FILHO, A.E.; MADALENA, F.E. et al. **Endogamia e tamanho efetivo populacional na raça Sindi**. Anais do IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2002.

FARIA, F.J.C.; VERCESI FILHO, A.E.; MADALENA, F.E. et al. Estrutura genética da raça Sindi no Brasil. **Rev. Brasileira de Zootecnia**, vol 33, n.4, 2004.

GOYACHE, F., et al. Using pedigree information to monitor genetic variability of endangered populations: the Xalda sheep breed of Asturias as an example. **Journal of Animal breeding and genetics**, V. 120, April 2003.

GUTIERREZ, J.P.; CERVANTES, I.; MOLINA A.; VALERIA, M.; GOYACHE, F., 2008. Individual increase in inbreeding allows estimating realised effective sizes from pedigrees. **Genet. Sel. Evol.**, 40 (2008) 359-378.

# Efeitos das variáveis touros e estações do ano sobre a produção *in vitro* de embriões bovinos

## Effects of season and bulls on in vitro production of bovine embryos

Michele Cristiny Lempk Bolpato<sup>1,2</sup>, João Gabriel Viana Grázia<sup>3</sup>, Fernanda da Silva Gonçalves<sup>4</sup>, Thamiris Dornelas Araújo<sup>5</sup>, Carolina Capobianco R. Quintão<sup>6</sup>, Lilian Tamy Iguma<sup>6</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Parte do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) da primeira autora, financiado pelo CNPq e Embrapa

<sup>2</sup>Graduanda de Licenciatura em Ciências Biológicas – Centro de Ensino Superior (CES/JF). Bolsista CNPq. E-mail: michelecristiny\_jf@hotmail.com

<sup>3</sup>Ativa Embriões – Grupo Vitrogen. Laboratório de Reprodução Animal

<sup>4</sup>Pós-Doutoranda do Laboratório de Reprodução Animal – Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

<sup>5</sup>Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Genética e Biotecnologia – UFJF. Bolsista da Capes

<sup>6</sup>Laboratório de Reprodução Animal – Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

**Resumo:** O presente estudo teve como objetivo determinar os efeitos tanto das estações do ano quanto de touros sobre a produção *in vitro* de embriões (PIVE) bovinos, nos anos de 2011 e 2012, na região da Zona da Mata, MG. Ou seja, buscou avaliar a performance de doadoras de oócitos de 3 raças (Gir, Holandês e Girolando) leiteiras, durante as 4 estações do ano e também verificou o efeito do macho (dessas mesmas três raças), na PIVE. Não houve interação ( $P > 0,05$ ) entre estação do ano, raça da vaca e touro nas variáveis avaliadas. Observou-se que a média de oócitos/vaca, taxa de blastocisto e média de blastocistos/vaca foram menores na raça Holandesa ( $P < 0,05$ ). No verão, a taxa de clivagem foi menor do que no outono ( $P < 0,01$ ) e similar à primavera e inverno ( $P > 0,05$ ), mas não houve efeito significativo da estação do ano sobre a taxa de blastocistos e média de blastocistos/vaca, apesar de que, numericamente, no verão a produção média de blastocistos/vaca ( $4,5 \pm 0,4$ ) foi mais baixa do que no inverno ( $5,4 \pm 0,8$ ). Não houve efeito de touro ( $P > 0,05$ ) sobre a taxa de clivagem, taxa de blastocistos e números de blastocistos/vaca. Conclui-se que, nas condições desse experimento, os oócitos das vacas da raça Holandesa (*Bos taurus*), mantidas na Zona da Mata, foram menos competentes para desenvolverem-se a blastocistos do que os das raças Gir (*Bos indicus*) e Girolando (mestiço, cruzado), independente da estação do ano e do touro utilizado. O verão, na região da Zona da Mata, reduz a clivagem dos oócitos submetidos à fecundação *in vitro*, porém sem efeito significativo sobre a produção de blastocistos.

**Palavras-chave:** blastocistos, embriões, estresse térmico, oócitos, produção *in vitro*, temperatura durante o ano.

**Abstract:** This study aimed to evaluate the effect of season on bovine in vitro embryo production during the years 2011 and 2012 in the Zona da Mata region, taking into account the effect of oocyte donor breed (Gyr, Holstein and Gyrolando) and bull (three bulls). There was no interaction ( $P > 0,05$ ) between season, breed of cow and bull regarding analyzed data. The mean number of oocytes/cow, blastocyst rate and blastocyst/cow were lower ( $P < 0,05$ ) for Holsteins donors. Considering the Holstein breed, the cleavage rate was lower in summer than in autumn ( $P < 0,01$ ), and similar to spring and winter ( $P > 0,05$ ), but there was no significant effect of season on blastocyst rate and number of blastocyst/cow, although less numerically (absolut numbers) blastocysts/cow were produced in the summer ( $4,5 \pm 0,4$ ) than in the winter ( $5,4 \pm 0,8$ ). There was no effect of bull ( $P > 0,05$ ) on cleavage and blastocyst rate and numbers of blastocysts/cow. We conclude that, in our experimental conditions, oocytes from Holstein (*Bos taurus*) cows kept in the Zona da Mata are less competent to develop to blastocysts than Gir (*Bos indicus*) and Girolando (crossbred), regardless of season and bull used.

Summer in the Zona da Mata reduces the cleavage of oocytes undergoing in vitro fertilization but no significant effect on production of blastocysts.

**Keywords:** blastocysts, embryos, in vitro embryo production, oocytes, thermal stress, temperature during the year.

## Introdução

O Brasil é um país em que predomina o clima tropical, com temperatura média situada acima dos 20 °C e temperatura máxima acima de 30 °C, durante grande parte do ano (VIEIRA, 2012). Em consequência a essa elevada incidência de radiação solar, os animais de produção são constantemente submetidos ao estresse térmico (ET), variando de acordo com a estação.

As perdas econômicas e custos operacionais do setor agropecuário, atribuídos ao estresse térmico, são grandes, girando em torno de US\$ 1,7 bilhões anuais, principalmente devido ao aumento da mortalidade e à queda na eficiência reprodutiva (ST-PIERRE; COBANOV; SCHNITKEY, 2003).

Atualmente, várias biotécnicas têm sido introduzidas visando aumentar a produção dos bovinos, permitindo a expansão do mercado consumidor ávido por um produto de melhor qualidade a um menor custo. Uma das alternativas a ser utilizada nos programas de reprodução assistida é a produção *in vitro* de embriões (PIVE) que, além de sua relevância para estudos biotecnológicos, possui fundamento comercial.

Porém, a variação dos resultados da recuperação de oócitos e conversão em embriões é um grande desafio para a PIVE no contexto atual, o que leva à necessidade de pesquisas, entre elas, as causas relacionadas ao estresse térmico.

Nesse contexto, os efeitos das estações de ano sobre o sucesso da PIVE na região da Zona da Mata – MG precisam ser identificados e utilizados para se estabelecer mediados de mitigação dos seus possíveis efeitos deletérios sobre a produção de embriões. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar os efeitos da estação do ano sobre a produção de embriões *in vitro*, em estabelecimento comercial localizado na cidade de Juiz de Fora, localizada na zona da Mata de Minas Gerais, avaliando as interações com raça da vaca e touro.

## Material e Métodos

Os dados foram obtidos a partir de trabalhos realizados no laboratório comercial Ativa Embriões, Juiz de Fora, região da Zona da Mata do estado de Minas gerais, durante o período de outubro de 2011 a setembro de 2012. Os complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram coletados de doadoras das raças Gir, Holandês e Girolando mantidas em propriedades particulares localizadas principalmente na Zona da Mata de MG.

A maturação *in vitro* dos CCOs foi realizada em meio TCM 199 (Gibco, Rockville, MD, USA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e estrógeno, piruvato e antibióticos. Os CCOs de cada doadora foram maturados em grupos de 1 a 30 por gota de 70 µL.

Os CCOs maturados foram fecundados utilizando sêmen de touros provados. Para a preparação dos espermatozoides, utilizou-se o método do gradiente de Percoll (Nutricell, Campinas, SP, Brasil), nas concentrações de 90% e 45%, previamente mantido em estufa incubadora por 15 minutos antes do seu uso. A fecundação foi realizada em gota de 60 µL de meio FERT-TALP contendo  $2 \times 10^6$  espermatozoides/mL, sob óleo mineral, por um período de 18 a 22 horas.

Para o cultivo *in vitro* dos presumíveis zigotos, foi utilizado meio CR2 contendo SFB e albumina sérica bovina (BSA). Os embriões foram co-cultivados com células do cumulus, em gotas de 50 µL, sob óleo mineral. Após 72 horas do início do cultivo foi realizado o *feeding* (troca de 50% do meio contido na gota) e a avaliação da taxa de clivagem. No sexto dia após a fecundação (D6), foi realizado um novo *feeding*. Nos D6 e D7 foi avaliada a taxa de blastocisto.



Os dados de produção de oócitos/vaca e de blastocistos/vaca, taxa de clivagem e de blastocistos foram comparados por análise de variância pelo procedimento *Generalized Linear Model* (GLM) do SAS v 9.1 e as médias comparadas pelo teste de *Student Neuman Keuls*, considerando-se efeito da raça da fêmea, da estação de ano e do touro (indivíduo) e as interações entre eles. Os dados foram agrupados por estação do ano, considerando verão os meses de janeiro a março, outono os meses de abril a junho, inverno os meses de julho a setembro e primavera os meses de outubro a dezembro, por raça (Gir, Holandês e Girolando) e touro (tours 1, 2 e 3).

## Resultados e Discussão

Considerando a análise por raça da doadora, a média das repetições de produção de oócitos e de blastocistos/vaca e a taxa de blastocisto foram menores na raça holandesa ( $P < 0,05$  – Tabela 2) comparadas com as raças Gir e Girolando. Esses resultados corroboram com outros existentes na literatura e justificam-se por variações fisiológicas existentes entre as raças.

**Tabela 1.** Influência da raça da fêmea doadora de oócitos na produção *in vitro* de embriões bovinos (média  $\pm$  SE).

Raça	Rep	Oócitos/vaca (*n $\pm$ SE)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Blastocisto/vaca (*n)
Gir	50	9,7 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>	82,0 $\pm$ 2,9	48,7 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 0,5 <sup>a</sup>
Holandês	26	6,3 $\pm$ 0,7 <sup>b</sup>	80,7 $\pm$ 2,7	34,7 $\pm$ 3,2 <sup>b</sup>	3,0 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>
Girolando	119	11,2 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>	81,4 $\pm$ 1,3	43,4 $\pm$ 1,5 <sup>a</sup>	5,2 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>

Rep = número de repetições = número de doadoras aspiradas; \*n=valor calculado pela média de vacas aspiradas; <sup>a,b</sup>médias na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significativas ( $P < 0,05$ ).

Conforme relatado por Carvalho et al. (2008), de modo geral, a raça Gir apresenta maior número de folículos recrutados em cada onda de desenvolvimento folicular do que tem sido observado em doadoras de oócitos da raça Holandesa. Isso reflete-se numa maior produção embrionária (números absolutos) da raça zebuína acima citada quando comparada com média de oócitos recuperados e viáveis por animal da raça Holandesa. Além disso, dentre outros fatores, há que considerar que animais *Bos taurus taurus* Sendo essa última uma raça pouco adaptada ao clima tropical e que apresenta um baixo potencial de desenvolvimento *in vitro* o ano inteiro, produzindo oócitos de qualidade inferior, o que, por conseguinte vai interferir nas taxas de blastocistos.

As vacas mestiças Girolanda (cruzamento Gir x Holandês), apresentaram resultados superiores aos da raça Holandês, mas semelhante aos da raça Gir, apesar de serem resultado de cruzamento entre Gir e Holandês. De acordo com Dias (2010), a heterose (vigor híbrido) atribuída aos animais mestiços F1, reflete-se numa redução da taxa de mortalidade, maior eficiência reprodutiva e maior precocidade nos mestiços quando comparados com os animais puros.

A comparação entre as estações do ano revelou uma variação na taxa de clivagem entre o verão e o outono ( $P < 0,01$ ) com uma porcentagem menor para o verão (Tabela 2). Não houve efeito significativo sobre o número de oócitos/vaca, taxa de blastocisto e número de blastocistos/vaca, apesar do número de oócitos/vaca e de blastocisto/vaca serem numericamente maior no inverno do que no verão.

**Tabela 2.** Influência da estação do ano na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Estação	Rep	Oócitos/vaca (*n)	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Blastocisto/vaca (n*)
Verão	54	8,7 ± 0,8	76,9 ± 3,0 <sup>b</sup>	42,9 ± 3,0	4,5 ± 0,4
Outono	57	10,3 ± 0,8	87,3 ± 1,2 <sup>a</sup>	46,9 ± 2,1	4,9 ± 0,3
Inverno	40	12,0 ± 1,7	81,2 ± 2,2 <sup>ab</sup>	37,9 ± 2,4	5,4 ± 0,8
Primavera	44	10,1 ± 0,8	79,8 ± 2,1 <sup>ab</sup>	45,4 ± 3,3	4,7 ± 0,4

Rep = número de repetições = número de doadoras aspiradas; \*n = valor calculado pela média das repetições;

<sup>a,b</sup> médias na mesma coluna com letras diferentes apresentam diferenças significativas (P < 0,01).

No verão, a incidência do estresse térmico sobre as vacas é maior, reduzindo o índice de concepção, entre 20 e 30%, em comparação com os meses do inverno. Quando CCOs são submetidos a altas temperaturas (40 °C e 41 °C), o potencial de desenvolvimento *in vitro* torna-se baixo (AL-KATANANI et al., 2002); reduzindo as taxas de clivagem e de blastocistos no dia 8 após a FIV (ROTH; HANSEN, 2004). Edwards e Hansen (1997) também asseguraram que a maturação de oócitos, durante o verão, reduz a taxa de clivagem e de proporção de oócitos que evoluem até blastocistos. O período de outono foi caracterizado pela transição entre temperaturas média e máxima, o que pode ter influenciado a diferença observada na clivagem. Contudo, esta diferença não resultou em variação na taxa de blastocistos e no número de blastocistos/vaca, sugerindo que apesar da menor taxa de clivagem, os embriões que se dividiram foram aptos a se tornar blastocistos.

Não se observou diferença entre os touros (P > 0,05 - Tabela 3), a despeito do que foi relatado em outros estudos (CAMARGO et al., 2002), já que é de amplo conhecimento que o fator touro exerce um papel importante na produção de embriões. Contudo, diferenças de resultados entre touros podem ser minimizadas pela escolha de touros previamente selecionados para a fertilidade ou testados para a fecundação *in vitro*, o que geralmente ocorre nos laboratórios comerciais de PIVE.

**Tabela 3.** Influência de touros das raças Gir, Holandês e Girolando na produção *in vitro* de embriões bovinos.

Touro	Rep	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Blastocisto/vaca (*n)
1	111	81,5 ± 1,8	44,6 ± 2,1	4,5 ± 0,3
2	63	81,6 ± 1,3	42,7 ± 2,1	5,3 ± 0,5
3	21	81,1 ± 2,0	41,6 ± 2,0	5,4 ± 0,3

Rep = número de repetições; \*n = valor calculado pela média das repetições; 1 = Gir, 2 = Holandês, 3 = Girolando. Não há diferença entre touros (P > 0,05).

## Conclusões

Oócitos de vacas da raça Holandês mantidas na Zona da Mata Mineira, nas condições do presente trabalho, mostraram-se menos competentes para desenvolver-se até o estágio de blastocistos do que os das raças Gir e Girolando, independente da estação do ano e do touro utilizado, desde que este último fator (touro e partida de sêmen) tenha sido previamente testado para fertilidade. No verão, na região da Zona da Mata, a clivagem dos oócitos submetidos à fecundação *in vitro* é reduzida, porém sem efeito significativo sobre a produção de blastocistos.

## Agradecimentos

Ao CNPq.

## Literatura Citada

VIEIRA, M. R. **Influência do sombreamento de pastagens no desempenho reprodutivo de bovinos**. 2012. 40 f. Dissertação (Mestrado em Meio Ambiente e Sustentabilidade) - Centro Universitário de Caatinga, 2012.

ST-PIERRE, N.R.; COBANOV, B.; SCHNITKEY, G. Economic losses from heat stress by US livestock industries. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 52-77, 2003.

CARVALHO, J.B.; CARVALHO, N.A.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone- based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos Taurus* heifers. **Theriogenology**, v. 69, p. 167-175, 2008.

DIAS, A. L. G. **Avaliação do parto de vacas da raça holandesa inseminadas com Holandês ou Jersey e do desenvolvimento, Sanidade e concentração de imunoglobulinas dos bezerros**. 2010. 51 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade do Estado de Santa Catarina, Lages, 2010.

EDWARDS J. L, HANSEN P. J. Differential responses of bovine oocytes and preimplantation embryos to heat shock. **Molecular Reproduction and Development**, v. 46, p. 138-145, 1997.

CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; VIANA, J.H.M.; ARAÚJO, M.C.C. Efeito de concentração espermática e período de incubação oócito-espermatozoide na fecundação *in vitro* em bovinos da raça Gir. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.37, p.709-715, 2002.

# Efeito do FSH recombinante humano durante a maturação *in vitro* na competência oocitária em bovinos

Fernanda Bernardes Eugênio de Paula<sup>1,3</sup>, Eliza Diniz de Souza<sup>2</sup>, Thamiris Dornelas de Araújo<sup>2</sup>, Carolina Capobiango Romano Quintão<sup>2</sup>, Lilian Tamy Iguma<sup>2</sup>, Bruno Campos de Carvalho<sup>2</sup>, João Henrique Moreira Viana<sup>2</sup>, Luiz Sergio de Almeida Camargo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsita PIBIC, aluna do CES – JF. E-mail: Fernanda\_jfl@hotmail.com

<sup>2</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, MG

**Resumo:** A produção *in vitro* de embriões requer a indução hormonal para estimular a expansão das células do cumulus e maturação do oócito. O hormônio folículo estimulante (FSH) é um dos produtos utilizados na maturação *in vitro* dos oócitos. Porém, o disponível para bovinos no país é obtido da pituitária de suínos, podendo apresentar contaminações. Neste contexto, o objetivo do trabalho foi avaliar o efeito do FSH recombinante humano (rhFSH) sobre a taxa de embriões bovinos. Oócitos imaturos foram divididos em seis grupos de acordo com as doses do rhFSH, submetidos a maturação, fertilização e cultivo *in vitro*. Foram avaliadas as taxas de clivagem e de blastocistos no dia sete (D7) e dia oito (D8) pós-fecundação e os resultados submetidos a análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de clivagem entre os grupos com pFSH ( $88,6 \pm 3,9\%$ ) e as diferentes concentrações de rhFSH ( $89,6 \pm 2,7\%$ ;  $85,2 \pm 3,5\%$ ;  $92,1 \pm 2,7\%$  e  $90,3 \pm 5,0\%$  para 0,0105 UI, 0,021 UI, 0,042 UI e 0,084 UI, respectivamente). O grupo controle sem FSH apresentou a menor ( $P < 0,05$ ) taxa de clivagem ( $72,2 \pm 3,8\%$ ) do que os outros grupos. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de blastocistos no D7 entre todos os grupos. Entretanto, a taxa de blastocisto no D8 com 0,0105 UI rhFSH ( $53,0 \pm 3,6\%$ ) foi maior ( $P < 0,05$ ) do que sem FSH ( $33,5 \pm 4,5\%$ ) e 0,084 UI rhFSH ( $40,2 \pm 4,8\%$ ), porém foi semelhante aos grupos com pFSH ( $45,3 \pm 3,8\%$ ), 0,021 UI rhFSH ( $44,8 \pm 2,6\%$ ) e 0,042 UI rhFSH ( $47,0 \pm 2,5\%$ ). Conclui-se que as concentrações 0,0105 a 0,042 UI do rhFSH, podem ser utilizadas maturação *in vitro* de oócitos com resultados positivos para a produção de embriões.

**Palavras-chave:** Maturação oocitária, Hormônio Folículo Estimulante, Blastocistos.

**Abstract:** *In vitro* production of embryos requires hormonal stimulation to induce cumulus cells expansion and oocyte maturation. Follicle stimulating hormone (FSH) is one of the hormones used for oocyte *in vitro* maturation. However, the FSH currently available for cattle is obtained from pig pituitary and is subject to contamination. In this context, the aim of this study was to evaluate the effect of recombinant human FSH (rhFSH) on the quality of bovine embryos. Immature oocytes were distributed into six groups according to the dose of rhFSH followed by *in vitro* maturation and fertilization. Zygotes were cultured *in vitro* until blastocyst stage. Cleavage on day three and blastocyst on day seven (D7) and day eight (D8) after fertilization were evaluated and results were analyzed by analysis of variance and means compared by Duncan test. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in cleavage rate between the groups with pFSH ( $88.6 \pm 3.9\%$ ) and different concentrations of rhFSH ( $89.6 \pm 2.7\%$ ,  $85.2 \pm 3.5\%$ ,  $92.1 \pm 2.7\%$  and  $90.3 \pm 5.0\%$ ). The control group without FSH had lower ( $P < 0.05$ ) cleavage rate ( $72.2 \pm 3.8\%$ ) than the other groups. There was no difference ( $P > 0.05$ ) in blastocyst in D7 among all groups. However, in the blastocyst rate with D8 0.0105 IU rhFSH ( $53.0 \pm 3.6$ ) was higher ( $P < 0.05$ ) than without FSH ( $33.5 \pm 4.5\%$ ) and 0.084 IU rhFSH ( $40.2 \pm 4.8\%$ ), however was similar to groups with pFSH ( $45.3 \pm 3.8\%$ ), 0.021 IU rhFSH ( $44.8 \pm 2.6\%$ ) and 0.042 IU rhFSH ( $47.0 \pm 2.5\%$ ). It was concluded that concentrations of 0.0105 to 0.042 IU rhFSH may be used *in vitro* maturation of oocytes with positive results for the production of embryos.

**Keywords:** Maturation, Follicle Stimulating Hormone, Blastocysts.

## Introdução

O ano de 2011 foi muito significativo para o Brasil, que ocupa uma posição de destaque no que tange a produção *in vitro* de embriões, apresentando 15,7% de aumento quando comparado com o ano de 2010 (VIANA, 2012). No entanto, as biotécnicas apresentam algumas limitações que vem sendo amplamente discutidas e trabalhadas na tentativa de otimizar o processo. E neste contexto surgiu a oportunidade do uso do FSH recombinante humano como uma alternativa para se evitar os riscos de contaminações biológicas e para a obtenção de resultados mais consistentes, aumentando a repetibilidade e possibilitando melhor predição de sucesso das biotecnologias reprodutivas.

O Hormônio Foliculo Estimulante (FSH) tem um papel de grande relevância na produção *in vitro* de embriões. Este hormônio é utilizado no procedimento de maturação dos oócitos, com efeito na competência de desenvolvimento após a fecundação *in vitro*. Sua ação nos oócitos é mediada pelas células do *cumulus*, estimulando sua expansão (ZHANG et al., 2009). De acordo com estudo realizado *in vitro* por Magalhães et al. (2009), através da suplementação com FSH ao meio de cultivo, ocorre inibição da apoptose.

Atualmente o FSH disponível é importado e obtido de extratos da glândula pituitária de ovinos e suínos, o que dificulta a produção de um hormônio livre de contaminação por outras proteínas, como o hormônio luteinizante (LH) que interfere na ação do FSH, reduzindo a consistência dos resultados. Outro fator de grande relevância é que na obtenção do FSH da glândula pituitária também cria-se um risco potencial de transmissão de patógenos inter-especies, como príons.

O FSH humano recombinante (rhFSH) já vem sendo utilizado nos procedimentos de reprodução assistida, o qual proporciona menor variabilidade entre as partidas hormonais e ausência de contaminantes proteicos (ZWART-VAN RIJKOM et al., 2002). O rhFSH possui um sítio de glicosilação adicional que aumenta o tamanho do hormônio, diminuindo sua velocidade de filtração glomerular e aumentando a meia-vida na circulação.

Tem-se demonstrado que o uso de rhFSH apresenta fatores positivos na maturação de oócitos *in vitro* quando comparadas ao FSH da glândula pituitária, o que pode melhorar a competência oocitária no desenvolvimento de embriões. Espera-se que o efeito de uma maturação bem sucedida seja refletido em bons níveis de expansão das células do complexo cumulus-oócito (CCO) (CALDER et al., 2003), em melhores índices de produção de embriões *in vitro* (ALI E SIRARD, 2002).

Desta forma o objetivo do presente trabalho foi avaliar o efeito do rhFSH sobre a taxa de blastocistos bovinos.

## Material e Métodos

Foram utilizados ovários de fêmeas bovinas, abatidas de abatedouro. Os folículos ovarianos ( $\leq 10$  mm) foram puncionados por meio de agulha 21G acoplada a seringa de 10 mL e transferidos para um cálice de vidro. Após cerca de 15 minutos da aspiração, os oócitos decantaram no fundo do cálice. O sobrenadante foi descartado, o pellet com os oócitos foi lavado com meio *Talp-hepes* e transferido para uma placa de Petri contendo o mesmo meio. Em seguida, os oócitos (COC) de melhor qualidade foram selecionados e distribuídos em seis grupos, nos quais o meio TCM 199 foi, suplementado com diferentes doses de rhFSH ou FSH de suíno (pFSH): G1- controle com (10  $\mu$ g/mL) pFSH, G2- ausência de FSH, G3- 0,0105 UI rhFSH/0,5 mL, G4- 0,021 UI rhFSH/0,5 mL, G5- 0,042 UI rhFSH/0,5 mL e G6- 0,084 UI rhFSH/0,5 mL. Os CCOs permaneceram por 24 horas em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub> em atmosfera com umidade saturada a 38,5 °C.

Após a maturação, os oócitos foram transferidos para a placa contendo 70  $\mu$ L de meio FERT-TALP, acrescido de BSA, piruvato de sódio e heparina. O sêmen foi descongelado e os espermatozoides viáveis selecionados através do gradiente de Percol. A concentração de espermatozoides na gota de fertilização foi ajustada de forma a se obter uma dose fecundante de  $2 \times 10^6$ /mL e a placa de fertilização incubada nas mesmas condições da maturação *in vitro*, por um período de 18 a 20 horas.

Após a fecundação, os possíveis zigotos foram submetidos ao desnudamento com auxílio de um pipetador e lavados em meio TALP. O cultivo foi realizado em gotas de 50 µL de meio CR2aa acrescido de 10% SFB sob óleo mineral, distribuídos em placas de Petri 10 x 35 mm. A incubação ocorreu nas mesmas condições da fertilização por um período de 20 horas.

As taxas de produção embrionária foram avaliadas no sétimo dia (D7) e oitavo dia (D8) pós-fecundação e os resultados submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Duncan ao nível de significância de 5%.

## Resultados e Discussão

A expansão das células do *cumulus* foi observada em todos os grupos, com exceção do grupo sem FSH. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de clivagem entre os grupos com pFSH ( $88,6 \pm 3,9\%$ ) e as diferentes concentrações de rhFSH ( $89,6 \pm 2,7\%$ ;  $85,2 \pm 3,5\%$ ;  $92,1 \pm 2,7\%$  e  $90,3 \pm 5,0\%$ ). O grupo controle sem FSH apresentou a menor ( $P < 0,05$ ) taxa de clivagem ( $72,2 \pm 3,8\%$ ) do que os outros grupos. Não houve diferença ( $P > 0,05$ ) na taxa de blastocistos no D7 entre todos os grupos. Entretanto, a taxa de blastocisto no D8 com 0,0105 UI rhFSH ( $53,0 \pm 3,6\%$ ) foi maior ( $P < 0,05$ ) do que sem FSH ( $33,5 \pm 4,5\%$ ) e 0,084 UI rhFSH ( $40,2 \pm 4,8\%$ ), porém foi semelhante aos grupos com pFSH ( $45,3 \pm 3,8\%$ ), 0,021 UI rhFSH ( $44,8 \pm 2,6\%$ ) e 0,042 UI rhFSH ( $47,0 \pm 2,5\%$ ) demonstrados na Tabela 1.

Em bovinos, Ali e Sirard (2002) encontraram um aumento significativo na taxa de mórula e blastocistos quando foram utilizados rhFSH e 17beta-estradiol quando comparadas as mesmas concentrações de pFSH combinado com E2; os autores associam tal fato à ausência de agentes contaminantes no rhFSH que facilitariam a interação positiva entre os hormônios. No experimento desenvolvido por Calder et al. (2003), todas as doses de rhFSH testadas induziram significativamente a expansão dos CCOs bovinos. No entanto, no trabalho proposto por Silvestre et al. (2006), não foram detectadas diferenças no desenvolvimento embrionário de suínos quando a concentração de rhFSH foi aumentada. Os próprios autores sugerem que seja possível que o intervalo de concentrações utilizado não tenha sido suficientemente grande para detectar diferenças significativas, e que a concentração mais baixa já deve ser eficaz em induzir a maturação dos oócitos e um maior desenvolvimento do embrião. Os dados indicam que pode ser possível, utilizando-se rhFSH, produzir embriões ao mesmo nível de eficiência dos produtos convencionalmente utilizados, mas com condições de maturação mais bem definidas.

**Tabela 1.** Efeito da adição de rhFSH ao meio de maturação com efeito na taxa de blastocistos bovinos.

Tratamentos	Grupos	n	Clivagem (%)	Blastocistos D7 (%)	Blastocistos D8 (%)
pFSH	1	130	$88,6 \pm 3,9a$	$45,6 \pm 4,5a$	$45,3 \pm 3,8abc$
0	2	165	$72,2 \pm 3,8b$	$31,8 \pm 5,8a$	$33,5 \pm 4,5c$
0,0105 UI rFSH	3	143	$89,6 \pm 2,7a$	$45,0 \pm 4,4a$	$53,0 \pm 3,6a$
0,021 UI rFSH	4	163	$85,2 \pm 3,5a$	$38,0 \pm 3,9a$	$44,8 \pm 2,6abc$
0,042 UI rFSH	5	96	$92,1 \pm 2,7a$	$39,5 \pm 4,2a$	$47,0 \pm 2,5ab$
0,084 UI rFSH	6	96	$90,3 \pm 5,0a$	$30,7 \pm 5,0a$	$40,2 \pm 4,8cb$

a,b,c – letras diferentes diferem estatisticamente na mesma coluna, ao nível de significância de 5% pelo teste de Duncan. Os dados são apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média.

## Conclusões

Conclui-se que FSH humano recombinante, testado nas concentrações entre 0,0105 a 0,042 UI, pode ser utilizado na maturação *in vitro* de oócitos bovinos com resultados similares ao pFSH quanto à produção de embriões.

## Agradecimentos

Ao CNPq

## Literatura Citada

- ALI, A.; SIRARD, M.A. The effects of 17beta-estradiol and protein supplement on the response to purified and recombinant follicle stimulating hormone in bovine oocytes. **Zygote**, v. 10, p. 65-71, 2002.
- CALDER, M.D.; CAVENEY, A.N.; SMITH, L.C.; WATSON, A.J. Responsiveness of bovine cumulus-oocyte-complexes (COC) to porcine and recombinant human FSH, and the effect of COC quality on gonadotropin receptor and C x 43 marker gene mRNAs during maturation in vitro. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 1, p. 14, 2003.
- MAGALHÃES, D.M.; FERNANDES, D.D.; ARAÚJO, V.R.; ALMEIDA, A.P.; MATOS, M.H.T.; FIGUEIREDO, J.R. Papel do Hormônio Folículo Estimulante na foliculogênese *in vivo* e *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**. Belo Horizonte, v.33, n.4, p.171-182. 2009
- SILVESTRE, M.A.; ALFONSO, J.; MENGUAL, E.G.; SALVADOR, I.; DUQUE, C.C.; MOLINA, I. Effect of recombinant human FSH and LH on in vitro maturation of porcine oocyte evaluated by the subsequent in vitro development of embryos obtained by in vitro fertilization, intracytoplasmic sperm injection or parthenogenetic activation. **Journal of Animal Science**. p. 09-11, 2006.
- VIANA, J.H.M. Levantamento estatístico da produção de embriões bovinos no Brasil em 2011: mudanças e tendências futura. **Jornal O embrião**, Foz do Iguaçu, p. 06-10. 2012.
- ZHANG, M.; OUYANG, H.; XIA, G. The signal pathway of gonadotrophins-induced mammalian oocyte meiotic resumption. **Molecular Human Reproduction**, v. 15, p. 399-409, 2009.
- ZWART, V.R.J.E.; BROEKMANS, F.J.; LEUFKENS, H.G. From HMG through purified urinary FSH preparations to recombinant FSH: a substitution study. **Human Reproduction**., v. 17, p. 857-865, 2002.

# Produção de embriões transgênicos por meio de microinjeção de vetores lentivirais em zigotos bovinos

Monique G. da Anunciação<sup>1,2</sup>, Thamiris D. de Araújo<sup>3,4</sup>, Eliza D. de Souza<sup>3,5</sup>, Fernanda B. E. de Paula<sup>2</sup>, Fernanda Gonçalves<sup>3</sup>, Carolina C. R. Quintão<sup>3</sup>, João Henrique M. Viana<sup>3</sup>, Lilian T. Iguma<sup>3</sup>, Luiz Sérgio A. Camargo<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Parte do Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) da primeira autora, financiado pelo CNPq e Embrapa E-mail: nique\_gomes20@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Graduanda de Licenciatura em Ciências Biológicas – Centro de Ensino Superior (CES/JF). Bolsista CNPq.

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>4</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>5</sup>Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, ES

**Resumo:** O uso de vetores lentivirais tem sido uma das mais recentes alternativas para a geração de animais geneticamente modificados (AGMs), usando a capacidade deste tipo de vírus de inserir seu material genético no genoma hospedeiro. O objetivo deste trabalho foi avaliar a produção de embriões bovinos geneticamente modificados por meio de microinjeção de vetores lentivirais no espaço perivitelino de zigotos (uma célula). Após a fecundação, os zigotos foram divididos aleatoriamente em três grupos: (GM) – microinjeção de vetores lentivirais contendo gene repórter *Green Fluorescent Protein* (GFP) no espaço perivitelino de zigotos; (CMT) – microinjeção de meio TALP no espaço perivitelino de zigotos; (GC) – oócitos maturados *in vitro* e submetidos à FIV (fertilização *in vitro*) sem desnudamento, não submetidos à microinjeção. Observou-se que a taxa de blastocistos no D8 (D0 = dia da fertilização) dos grupos CMT e GC foi superior à do grupo GM. Esse resultado pode indicar que, nas condições do presente estudo, o vetor lentiviral contendo o gene GFP veio a causar algum efeito deletério na formação de blastocistos. Por outro lado, observou-se que a taxa de embriões expressando GFP (fluorescência) foi alta em relação ao número total de zigotos microinjetados (77%). Esses resultados sugerem que, a despeito da menor taxa de blastocistos observada no grupo GM, a técnica de microinjeção de vetores lentivirais em zigotos pode ser de grande valia e capaz de produzir embriões bovinos transgênicos.

**Palavras-chave:** microinjeção, transgênicos, vetor lentiviral.

**Abstract:** The use of lentiviral vectors has been one of the most recent alternative for the generation of genetically modified animals (GMAs) by using the ability of such viruses to insert themselves into the host genome. The aim of this study was to evaluate the production of genetically modified bovine embryos by microinjection of lentiviral vectors in the perivitelline space of zygotes (one cell). After fertilization, zygotes were randomly divided into three groups: (GM) - microinjection of lentiviral vectors containing the *Green Fluorescent Protein* (GFP) reporter gene in the perivitelline space of zygotes; (CMT) – microinjection of TALP medium in the perivitelline space of zygotes; (GC) – in vitro matured and fertilized oocytes still surrounded by few cumulus cell layers, not subjected to microinjection. On Day 8 (D0 = day of fertilization), the rate of blastocyst for CMT and GC groups was higher than for GM treatment. Maybe because factors related to the exogenous DNA impair deleterious effects on the blastocyst formation. Despite these data, it is necessary to consider that GFP expression rate within GM group was very high (77%). Therefore, we suggested that the microinjection of lentiviral vectors into the perivitelline space of bovine zygotes may be a reliable technique to generate transgenic bovine embryos.

**Keywords:** microinjection, lentiviral vector, transgenic.



## Introdução

O aprimoramento de biotécnicas aplicadas à reprodução animal tem sido de grande importância na geração de animais transgênicos, imprimindo a eles características de interesse que podem beneficiar desde a produção animal até a biomedicina. A transgenia pode ainda contribuir para gerar bovinos mais resistentes a doenças ou animais produtores de alimentos de melhor qualidade, por meio de melhorias na composição do produto. Há ainda a possibilidade da produção de biofármacos, que possam ser recuperados secreção e purificados a partir do leite secretado por animais de médio e grande porte (caprinos e bovinos, por exemplo) (LISAUSKAS, 2008).

Uma das primeiras técnicas e ainda comumente utilizadas para a geração de animais geneticamente modificados é a microinjeção pronuclear (MPN), que é empregada desde a década de 1980, principalmente em camundongos. No entanto, sua eficiência é baixa (MURAKAMI et al., 1999).

Uma alternativa sugerida há pouco tempo, para a obtenção de embriões geneticamente modificados, é a que vem utilizando vetores lentivirais. Este método baseia-se na capacidade destes vírus integrarem seu material genético no genoma do hospedeiro (TENORIO et al.; 2008). Os lentivírus pertencem à família *Retroviridae*, a qual possui genoma composto por duas fitas simples de RNA e enzima transcriptase reversa, que é responsável por sintetizar o cDNA a partir do RNA. Geralmente, são derivados de vírus que causam imunodeficiência, como o HIV-1, que são os representantes mais bem conhecidos dos lentivírus, em face dos seus efeitos patológicos. No entanto, para a construção do vetor lentiviral, sequências relacionadas à patogenicidade e autorreplicação são retiradas e as estruturas constituintes são separadas em múltiplos fragmentos para torná-lo mais biosseguro (TENORIO et al.; 2008). Entre as vantagens do uso dos vetores lentivirais estão: a capacidade de inserção de uma única cópia do transgene, ao contrário do que pode acontecer com outros métodos; as inserções ocorrerem em regiões transcricionalmente ativas, reduzindo possíveis problemas de silenciamento do transgene; e a grande maioria dos animais nascidos serem geneticamente modificados (ADAMS & VAN DER WEYDEN, 2008).

Vale ressaltar que, em vista da recente adoção do método com vetores lentivirais, a literatura, majoritariamente, reporta estudos conduzidos com camundongos (ADAMNS & VAN DER WEYDEN, 2008). Porém, como é de amplo conhecimento, o modelo bovino apresenta particularidades. E, apesar de Ewerling et al., (2006) terem demonstrado que a geração de embriões bovinos geneticamente modificados ter sido mais eficiente por meio da microinjeção no espaço perivitelino de oócitos maturados *in vitro*, outra alternativa seria avaliar índices técnicos com o uso dessa técnica no espaço perivitelino de zigotos bovinos, o que constituiu alvo deste estudo.

## Material e Métodos

Os complexos *cumulus*-oócitos (CCOs) foram obtidos de ovários coletados em abatedouro. Os folículos ovarianos (2 a 8 mm) foram puncionados utilizando-se agulha 21G acoplada a seringa de 10 mL. Em seguida, os CCOs, foram recuperados e classificados quanto ao número de células do *cumulus* (mais de 3) e homogeneidade do citoplasma. Posteriormente, os CCOs selecionados prosseguiram para a MIV, em meio TCM199 (*Tissue Culture Medium* 199) (Gibco, Carlsberg, CA, EUA) com FSH (Hormônio Folículo Estimulante; Pluset®, Calier, Serono, Itália), soro de vaca em cio, piruvato e antibióticos. Os CCOs foram distribuídos em grupos de 30 a 40 estruturas por poço de cultivo (400 µL) e maturados em estufa incubadora com 5% de CO<sub>2</sub>, umidade saturada, a 38,5 °C por 22 horas.

Após a maturação, os oócitos foram submetidos à fecundação *in vitro* com 4 x 10<sup>6</sup> espermatozoides/mL e divididos aleatoriamente em três grupos conforme segue: GM – grupo de zigotos com seis horas pós-fecundação que passaram por microinjeção no espaço perivitelíneo de lentivírus contendo gene repórter GFP; CMT – grupo de zigotos seis horas pós-fecundação microinjetados com meio TALP no espaço perivitelíneo; GC

(grupo controle) – CCOs maturados, fertilizados e cultivados *in vitro*, ou seja, eram zigotos produzidos seguindo protocolo de rotina de PIVE (Produção *in vitro* de Embriões) do laboratório e não submetidos à microinjeção. Os grupos GM e CMT foram submetidos ao desnudamento com hialuronidase imediatamente antes dos procedimentos de microinjeção. Os zigotos do grupo GC foram cultivados em meio CR2aa suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), a 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico, umidade saturada e temperatura de 38,5 °C, enquanto os zigotos dos grupos CMT e GM foram cultivados em meio SOF a 2,5% SFB em estufa a 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> e 90% N<sub>2</sub> em condições de temperatura e umidade idênticas a GC. Todos os grupos foram mantidos em cultivo por oito dias, em uma concentração de 15-20 estruturas por gota.

A eficiência da transfecção foi calculada baseada na quantidade de embriões expressando GFP a partir do total de zigotos microinjetados (GM). A avaliação da expressão do GFP foi realizada visualmente, em blastocistos, por meio de exposição dos mesmos à luz ultravioleta em estereomicroscópio (Nikon, SMZ 800, filtro de 450-490 nm) ou microscópio de fluorescência (Motic, BA400, filtro de 465-495 nm). Os dados foram comparados por teste de qui-quadrado, considerando nível de significância  $P < 0,05$ , sendo mostrados os valores das médias dos tratamentos.

## Resultados e Discussão

Conforme os dados observados na tabela 1, a taxa de blastocistos no dia 8 após fecundação (D8), para os grupos GC e do CMT (19,0% e 16,3%, respectivamente) foi superior ( $P < 0,05$ ) à observada em GM. O maior índice de blastocistos de GC em D8 pode ser um reflexo de sua maior taxa de clivagem e de blastocistos nos D3 e D7, respectivamente; o que não ocorreu no CMT. Entretanto, o fato do grupo CMT não ter apresentado diferença significativa ( $P > 0,05$ ) nas taxas avaliadas em D7 e D8, quando comparado com o controle GC, indicou que a micromanipulação e o desnudamento não impuseram injúrias capazes de comprometer o desenvolvimento até o estágio de blastocisto. No entanto, observou-se que o tratamento GM teve taxas de blastocistos em D7 e D8 inferiores a dos demais grupos experimentais. O que pode ser atribuído ao fato dos vetores lentivirais terem exercido algum efeito deletério no desenvolvimento dos zigotos microinjetados com eles. Outra possibilidade repousa na questão de que pode haver diferenças nos resultados dependendo da partida de vetores lentivirais utilizada (condições de obtenção, ausência de contaminantes, condições de armazenamento, quantificação). Isso porque em experimentos mais recentes do nosso laboratório, foram obtidos dados que mostraram não ter havido diferença entre zigotos microinjetados ou não com vetores lentivirais.

Em trabalho semelhante, Hofmann et al. (2004) injetaram vetores lentivirais no espaço perivitelino de zigotos e apenas 22% dos zigotos infectados se desenvolveram até o estágio de blastocisto, resultando no nascimento de quatro bezerros, mas nenhum deles transgênico. Em relação à expressão da proteína GFP nos blastocistos, a taxa de embriões transgênicos do presente estudo foi semelhante à obtida por Hofmann et al. (2004), que alcançou 83% de embriões expressando GFP com a microinjeção de vetores lentivirais e está acima de valores relatados com o uso da microinjeção pronuclear (11,9%) para bovinos (MURAKAMI et al., 1999).

**Tabela 1.** Efeito da injeção de vetores lentivirais carreando transgene da proteína verde fluorescente (GFP) no espaço perivitelínico de zigotos bovinos produzidos *in vitro*, seis horas pós-fecundação.

Grupos	N	Clivagem (%)	Blastocistos D7 (%)	Blastocistos D8 (%)	Embriões GFP + (%)
<b>GC</b> (Controle FIV)	269	72,1 <sup>a</sup>	14,5 <sup>a</sup>	19,0 <sup>a</sup>	0
<b>CMT</b> (Controle de microinjetados com TALP)	209	49,0 <sup>b</sup>	12,4 <sup>a</sup>	16,3 <sup>a</sup>	0
<b>GM</b> (Microinjetados com vetores lentivirais)	233	40,8 <sup>b</sup>	3,4 <sup>b</sup>	3,8 <sup>b</sup>	77,8

<sup>a,b</sup>Valores com letras diferentes entre colunas diferem significativamente ( $P < 0,05$ ). Qui-quadrado.

## Conclusões

Os resultados aqui expostos demonstraram que o procedimento de microinjeção de vetores lentivirais no espaço perivitelínico de zigotos, seis horas pós-fecundação, resultou em baixa taxa de desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto, mas a expressão da GFP foi elevada (77,8%). Assim sendo, este trabalho sugere que a técnica pode vir a ser uma alternativa frente à microinjeção pronuclear, em vista do que a literatura relata. No entanto, novos estudos devem ser conduzidos com outras partidas de vetores lentivirais para se certificar a respeito de sua possível toxicidade sobre o desenvolvimento embrionário. E também para a busca e avaliação de melhores índices técnicos, incluindo taxas de prenhez e nascimento de animais transgênicos.

## Agradecimentos

Ao CNPq

## Literatura Citada

- ADAMS D.J.; VAN, DER, WEYDEN, L. Contemporary approaches for modifying the mouse genome. **Physiological Genomics**, v 34, p. 225-238, 2008.
- EWERLING S, HOFMANN A, KLOSE R, WEPPERT M, BREM G, RINK K, PFEIFER A, WOLF E. Evaluation of laser-assisted lentiviral transgenesis in bovine. **Transgenic Research**, v. 15, p. 447-454, 2006.
- HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; SEBALD, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 71, p 405-409, 2004.
- LISAUSKAS, S.F.C. **Animais transgênicos utilizados como biorreatores**. 2008, 124 p. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2008.
- MURAKAMI, M.; FAHRUDIN, M.; VARISANGA, M. D.; SUZUKI, T. Fluorescence expression by bovine embryos after pronuclear microinjection with the EGFP gene. **Journal of Veterinary Medical Science**. v.61, p.843-847, 1999.
- TENÓRIO, L. Z.; SILVA, F. H.; HANS, S. W. A potencialidade dos lentivetores na Terapia Gênica. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 6, p. 260-267, nov./dez. 2008.

# Conteúdo de DNA de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa

## DNA content of accessions of Napiergrass Active Germplasm Bank of Embrapa

Tadiana Luiza Fernandes<sup>1</sup>, Carolina de Souza Fonseca<sup>2</sup>, Ana Luisa Sousa Azevedo<sup>3</sup>, Juliane Dornellas Nunes<sup>4</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>3</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>3</sup>, Antonio Vander Pereira<sup>3</sup>, Fausto de Souza Sobrinho<sup>3</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bióloga formada pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Bolsista PIBIC CNPq. e-mail: tadi\_lufe2011@hotmail.com

<sup>2</sup>Bióloga formada pelo Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora

<sup>3</sup>Pós-Doutoranda da Embrapa Gado de Leite. e-mail: judornellas@gmail.com

<sup>4</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. e-mail: ana.azevedo@embrapa.br

**Resumo:** O objetivo do presente trabalho foi realizar a caracterização citogenética por meio da determinação do conteúdo de DNA dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa (BAGCE). A caracterização foi realizada em 94 acessos do BAGCE e na cultivar Pioneiro por meio da citometria de fluxo. O conteúdo de DNA foi estimado utilizando como padrão de referência interno, a soja (*Glycine max*). Observou-se que a quantidade de DNA entre os acessos variou de 4,3 pg a 5,9 pg. O acesso BAGCE 55 apresentou quantidade de DNA diferente dos demais, equivalente a 8,79 pg. A diferença na quantidade de DNA dos acessos possibilitou a divisão destes em três grupos distintos (A, B e C). Apesar de ter havido a divisão dos acessos em grupos, a quantidade de DNA presente nos grupos B e C foi próxima e, além disso, ambos apresentaram conteúdo de DNA de acordo com os valores já relatados para *Pennisetum purpureum*. Com base nos resultados obtidos conclui-se que há variabilidade genética entre os acessos do BAGCE para o conteúdo de DNA. O elevado conteúdo de DNA do acesso BAGCE 55 subsidia sua classificação como uma espécie selvagem de *Pennisetum*.

**Palavras-chave:** *Pennisetum purpureum*, citometria de fluxo, citogenética, DNA.

**Abstract:** The objective of this study was to characterize cytogenetic determination of DNA content of accessions Napiergrass Active Germplasm Bank of Embrapa (BAGCE). The characterization was performed in 94 accessions BAGCE and Pioneiro by flow cytometry. DNA content was estimated using as internal reference standard, soybean (*Glycine max*). It was observed that the amount of DNA between accesses ranged from 4.3 pg and 5.9 pg. Accession BAGCE 55 showed DNA content different from others, equivalent to 8.79 pg. The difference in DNA of the accessions allowed the division into three groups (A, B and C). Although the division into groups, the content of DNA present in the accessions of the groups B and C was similar and, in addition, showed DNA content on the expected patterns for *Pennisetum purpureum*. Based on the results obtained it was concluded that there is genetic variability among accessions BAGCE for DNA content. Accession BAGCE 55 shows differences of DNA content expected for *Pennisetum*.

**Keywords:** *Pennisetum purpureum*, flow cytometry, cytogenetic, DNA.

### Introdução

O capim-elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.) é uma espécie forrageira nativa do continente Africano, que foi introduzida no Brasil no início do século XX (DAHER et al. 1997). Por apresentar características de elevado potencial de produção de matéria seca, valor nutritivo, qualidade, palatabilidade, vigor, persistência e versatilidade de usos, o capim-elefante é considerado uma das forrageiras mais importantes (PEREIRA et al. 2008).

A Embrapa Gado de Leite foi responsável pela criação do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante (BAGCE) no início da década de 1980 e a principal função deste banco é a conservação da variabilidade genética do gênero *Pennisetum*. Caracterizações e avaliações morfológica, agrônômica e molecular dos acessos do BAGCE foram realizadas, sendo essas avaliações eficientes em diferenciar os acessos e separá-los em grupos relativamente homogêneos.

A caracterização citogenética por meio da avaliação do conteúdo de DNA dos acessos é importante para ampliar as informações sobre o germoplasma conservado e consequentemente promover o uso da variabilidade genética em programas de melhoramento e/ou pré-melhoramento genético de capim-elefante (MACHADO et al. 2012). O objetivo do trabalho foi determinar o conteúdo de DNA dos acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa por meio da citometria de fluxo.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite, localizado em Juiz de Fora, Minas Gerais, nos meses de Junho a Setembro de 2012. Foi avaliado o conteúdo de DNA de 94 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa (BAGCE), e da cultivar Pioneiro (testemunha). Os genótipos foram cultivados em vasos plásticos de 9,0 L com substrato contendo mistura de solo, areia e esterco na proporção 1:1:1, em casa de vegetação. De cada acesso retirou-se amostra constituída de três folhas jovens.

Para análise das amostras, foram triturados em placa de Petri, com o auxílio de um bisturi, 20-30 mg de tecido foliar jovem, com a mesma quantidade de tecido foliar jovem do padrão interno de referência *Glycine max* (soja), juntamente com 800  $\mu$ L de solução tampão LB01 para obtenção de suspensão nuclear (DOLEZEL, 1997). Após a trituração total dos tecidos foliares, estes foram aspirados por uma pipeta descartável juntamente com duas camadas de gaze, e em seguida, a suspensão foi filtrada em uma malha de 50  $\mu$ m. Foram adicionados à suspensão nuclear 25  $\mu$ L de iodeto de propídeo e 25  $\mu$ L de RNase.

As amostras foram analisadas no citômetro FACS Calibur (Becton Dickinson). Os histogramas foram obtidos no *software Cell Quest* e analisados no *software WinMDI 2.8* (disponível em: <http://facs.scripps.edu/software.html>). O conteúdo de DNA nuclear (pg) das amostras foi estimado por comparação com a posição em relação ao pico G1 do padrão interno de referência *Glycine max* (2,5 pg). Foram analisados pelo menos 10 mil núcleos de cada amostra.

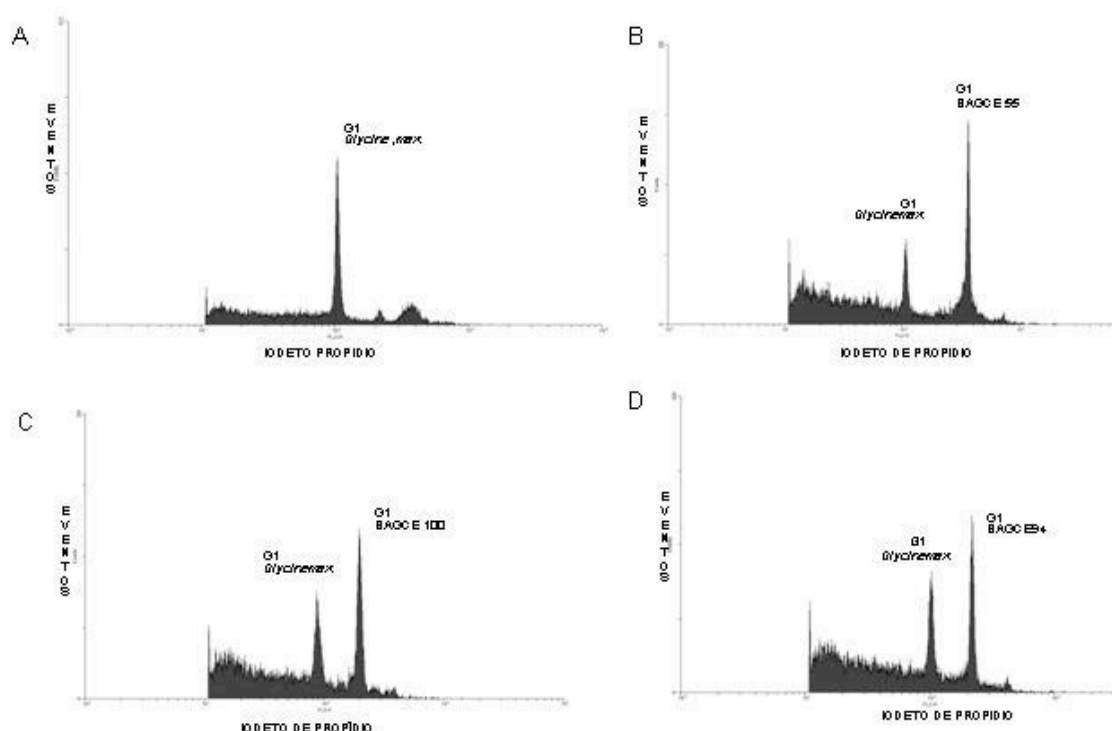
Para cada acesso, três amostras foram avaliadas, sendo cada uma delas considerada como uma repetição. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente ao acaso. Foram obtidos o desvio padrão fenotípico, o desvio padrão da amostra e o intervalo de confiança. Também foi realizado teste de comparação de médias de Scott e Knott a 5% de probabilidade.

## Resultados e Discussão

Foram detectadas diferenças no conteúdo de DNA dos acessos do BAGCE (Figura 1). Dos 95 genótipos analisados, observou-se que, 94 deles possuem quantidade de DNA que variou entre 4,3 pg e 5,9 pg. O conteúdo de DNA do capim-elefante é de 4,6 pg, portanto, os resultados encontrados estão de acordo com o relatado na literatura (MARTEL et al. 1997). O acesso BAGCE 55 apresentou conteúdo de DNA de 8,79 pg.

O acesso BAGCE 55, cujo nome comum é Kizozi, possuía identificação no BAGCE como sendo da espécie *P. purpureum* ( $2n=4x=28$  cromossomos). Apesar de ser semelhante morfológicamente aos demais acessos que constituem o BAGCE, concluiu-se que não se trata de um representante da espécie *P. purpureum*, mas sim, uma espécie selvagem do gênero *Pennisetum* (TECHIO 1998). A maior quantidade de DNA observada no BAGCE 55 está diretamente relacionada a variações cromossômicas numéricas já relatadas neste acesso (DAVIDE et al., 2007). Estes resultados subsidiam a

reclassificação do acesso na coleção de germoplasma, e evidenciam a importância da caracterização citogenética no manejo e conservação de germoplasma.



**Figura 1.** Histograma de citometria de fluxo para quantificação de DNA. A) Pico G1 do padrão de referência *Glycine max*. B) Pico G1 do acesso BAGCE 55 equivalente a 8,79 pg. C) Pico G1 do acesso BAGCE 100 equivalente a 5,85 pg. D) Pico G1 do acesso BAGCE 94 equivalente a 5,18 pg.

Devido à variação do conteúdo de DNA entre os acessos do BAGCE, foram formados três grupos estatisticamente distintos (Tabela 1). O grupo A, é composto exclusivamente pelo acesso BAGCE 55, já discutido anteriormente. No grupo B, o acesso que apresentou maior conteúdo de DNA foi o BAGCE 29 com 5,94 pg. O menor conteúdo de DNA foi observado no acesso BAGCE 49, correspondente a 5,37 pg. A diferença da quantidade de DNA entre o BAGCE 29 e o BAGCE 49 foi de 0,56 pg. Entre os acessos do grupo C, o BAGCE 39 foi o acesso com maior conteúdo de DNA, equivalente a 5,36 pg e o acesso Pioneiro com menor quantidade, referente a 4,31 pg. A diferença entre o maior e o menor valor, foi de 1,05 pg.

A ampla variabilidade genética existente dentro do gênero *Pennisetum*, pode ter levado às diferenças no conteúdo de DNA entre os acessos do BAGCE, e, além disso, pode estar relacionada com as diferentes procedências dos mesmos. Constatou-se que os grupos B e C são diferentes (estatisticamente), porém, ambos apresentam conteúdo de DNA que se encontram dentro do padrão existente na literatura para *P. purpureum* (MARTEL et al. 1997). Em relação às médias de tais grupos (5,62 pg e 5,11 pg respectivamente), foi observado que a diferença entre elas foi de 0,5 pg. Apesar de os acessos terem sido divididos em três grupos distintos, o conteúdo de DNA dos acessos dos grupos B e C é próxima.

**Tabela 1.** Estimativas do conteúdo de DNA de acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-elefante da Embrapa.

Acessos	Conteúdo de DNA (pg)	Acessos	Conteúdo de DNA (pg)	Acessos	Conteúdo de DNA (pg)
BAGCE 55	8,79 a <sup>1</sup>	BAGCE 16	5,32 c	BAGCE 06	5,11 c
BAGCE 29	5,94 b	BAGCE 30	5,31 c	BAGCE 99	5,11 c
BAGCE 33	5,90 b	BAGCE 60	5,30 c	BAGCE 127	5,09 c
BAGCE100	5,85 b	BAGCE 71	5,30 c	BAGCE 07	5,08 c
BAGCE 26	5,82 b	BAGCE 04	5,29 c	BAGCE 17	5,08 c
BAGCE 24	5,79 b	BAGCE 22	5,29 c	BAGCE 20	5,08 c
BAGCE 96	5,78 b	BAGCE 98	5,26 c	BAGCE 51	5,08 c
BAGCE 36	5,77 b	BAGCE 25	5,26 c	BAGCE 91	5,08 c
BAGCE 74	5,73 b	BAGCE 80	5,25 c	BAGCE 101	5,07 c
BAGCE 82	5,71 b	BAGCE 72	5,24 c	BAGCE 66	5,07 c
BAGCE 32	5,66 b	BAGCE 102	5,22 c	BAGCE 21	5,06 c
BAGCE 35	5,66 b	BAGCE 126	5,22 c	BAGCE 75	5,06 c
BAGCE 95	5,62 b	BAGCE 65	5,22 c	BAGCE 62	5,06 c
BAGCE 97	5,62 b	BAGCE 92	5,22 c	BAGCE 88	5,05 c
BAGCE 58	5,61 b	BAGCE 14	5,20 c	BAGCE 18	5,05 c
BAGCE 31	5,59 b	BAGCE 13	5,20 c	BAGCE 40	5,05 c
BAGCE 27	5,55 b	BAGCE 79	5,20 c	BAGCE 68	5,05 c
BAGCE 15	5,54 b	BAGCE 70	5,18 c	BAGCE 86	5,04 c
BAGCE 34	5,53 b	BAGCE 94	5,18 c	BAGCE 08	5,04 c
BAGCE 77	5,52 b	BAGCE 11	5,16 c	BAGCE 64	5,02 c
BAGCE 57	5,51 b	BAGCE 56	5,16 c	BAGCE 73	5,01 c
BAGCE 83	5,51 b	BAGCE 38	5,16 c	BAGCE128	5,01 c
BAGCE 02	5,51 b	BAGCE 03	5,16 c	BAGCE 37	5,00 c
BAGCE 23	5,47 b	BAGCE 19	5,15 c	BAGCE 12	5,00 c
BAGCE 52	5,46 b	BAGCE 59	5,15 c	BAGCE 76	4,98 c
BAGCE 53	5,46 b	BAGCE 54	5,15 c	BAGCE 61	4,93 c
BAGCE 05	5,46 b	BAGCE 67	5,15 c	BAGCE 63	4,93 c
BAGCE 85	5,43 b	BAGCE 129	5,15 c	BAGCE 01	4,90 c
BAGCE 49	5,38 b	BAGCE 78	5,14 c	BAGCE 69	4,74 c
BAGCE 39	5,36 c	BAGCE 93	5,12 c	BAGCE 10	4,61 c
BAGCE 50	5,34 c	BAGCE 09	5,12 c	Pioneiro	4,31 c
BAGCE 28	5,32 c	BAGCE 81	5,12 c		

<sup>1</sup>Médias seguidas pela mesma letra pertencem ao mesmo grupo pelo teste de Scott e Knott a 5% de probabilidade

## Conclusões

Com base nos resultados obtidos conclui-se que há variabilidade genética entre os acessos do BAGCE para o conteúdo de DNA. O acesso BAGCE 55 apresenta diferença do conteúdo de DNA esperado para a espécie *P. purpureum*.

## Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig) pelo apoio financeiro.

## Literatura Citada

DAHER, R.F.; MORAES, C.F.; CRUZ, C.D.; PEREIRA, A.V.; XAVIER, D.F. Diversidade Morfológica e Isozimática em Capim-Elefante (*Pennisetum purpureum* Schum.). **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.26, n.2, p. 255-264, 1997

DAVIDE, L.C.; TECHIO, V.H.; NUNES, J.D.; PEREIRA, A.V. Variação cromossômica numérica em *Pennisetum*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v.31, n. 2, p. 398-405, 2007

DOLEZEL, J. Application of flow cytometry for the study of plant genomes, **Journal of applies Genetics**, v.38, n.3, p. 285-302, 1997.

MACHADO, J.C.; MARTINS, C.E.; AUAD, A.M.; ROCHA, W.S.D.; LÉDO, J.F.S.; PEREIRA, A.V.; SOBRINHO, F.S.; BENITES, F.R.G. **Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante: Avaliação da Resistência à Cigarrinha-das-pastagens e Tolerância à Toxidez por Alumínio**. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 159). 27 p. 2012.

MARTEL, E.; DE NAY, D.; SILJAK-YAKOVLEV.; BROWN, S.; SAAR, A. Genome size variation and basic chromosome number in Pearl Millet and fourteen related *Pennisetum* species. **Journal of heredity**, v.88, n.2, p. 139-143, 1997.

PEREIRA, A.V., LÉDO, F.J.S. Melhoramento genético de *Pennisetum purpureum*. In: RESENDE, R.M.S., VALLE, C.B. and JANK, L. **Melhoramento de Forrageiras Tropicais**. Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, p. 89-116, 2008.

TECHIO, V.H. **Citotaxonomia de algumas espécies de híbridos interespecíficos de *Pennisetum***. 1998. 112 f. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento de plantas). Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1998.



# Viabilidade de pólen em plantas de *Brachiaria ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente<sup>1</sup>

## Feasibility of pollen plants of artificial *Brachiaria ruziziensis* tetraploidizadas

Anna Carolina Pereira Staico<sup>2</sup>, Letícia Santos Furtado<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>3</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>3</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>3</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trabalho parcialmente financiado com recursos do CNPq e Fapemig

<sup>2</sup>Bolsista de iniciação científica e estudante do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior (CES) de Juiz de Fora. E-mail: carol\_staico@hotmail.com; leticiafurtado@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite. E-mail: flavio.benites@embrapa.br; juarez.machado@embrapa.br; francisco.ledo@embrapa.br; fausto.souza@embrapa.br

**Resumo:** No Brasil, as gramíneas *Brachiaria decumbens*, *B. brizantha*, *B. humidicola* e *B. ruziziensis* estão entre as principais espécies utilizadas como forrageiras. Destas, só a *B. ruziziensis* é diplóide e sexual, as outras espécies comerciais são tetraplóides e apomíticas. A duplicação de genótipos da *B. ruziziensis* tem sido utilizada como estratégia para geração e exploração de variabilidade genética nas espécies tetraplóides de *B. brizantha* e *B. decumbens*. No entanto, os híbridos interespecíficos tem apresentado muitos problemas relacionados à meiose, dificultando ou inviabilizando a produção de sementes. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a viabilidade do pólen de plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente pelo uso da colchicina. Foram avaliadas 22 plantas tetraplóide de *B. ruziziensis*, juntamente com as cultivares Marandu (*B. brizantha*) e Basilisk (*B. decumbens*) utilizadas como testemunhas. Foram preparadas três lâminas por tratamento com o corante de Alexander e contados os pólenes viáveis e não viáveis em cinco campos aleatórios por lâmina. De modo geral, a viabilidade de pólen das plantas tetraplóides de *B. ruziziensis* foi elevada, superior às testemunhas, indicando que provavelmente a meiose desses materiais apresenta-se normal.

**Palavras-chave:** colchicina, duplicação cromossômica, meiose, melhoramento genético, nível de ploidia.

**Abstract:** In Brazil, the grasses of *Brachiaria decumbens*, *B. Brizantha*, *B. humidicola* and *B. ruziziensis* are among the main species used as fodder. Of these, only *B. ruziziensis* is diplóide sexual and other commercial species are tetraploid and apomictic. The duplication genotypes of *B. ruziziensis* has been used as a strategy for the generation and exploitation of genetic variability in wild tetraploid *B. Brizantha* and *B. decumbens*. However, interspecific hybrids has presented many problems will meiosis, hindering or impeding the production of seeds. The objective of this study was to evaluate the viability of the pollen of plants of *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificially through the use of colchicine. 22 tetraploid plants were evaluated *B. ruziziensis* along with Marandu (*Brachiaria*) and Basilisk (*B. decumbens*) used as control. Three slides were prepared by treatment with the dye and Alexander five random fields counted per slide. Pollens were counted viable and non-viable in all 24 treatments. In general, the feasibility of tetraploid pollen from plants of *B. ruziziensis* was high, exceeding the witnesses, probably indicating that these materials presents meiosis was normal.

**Key-words:** breeding, colchicine, chromosome duplication, meiotic, ploidy.

## Introdução

A pecuária no Brasil tem como base pastagens de gramíneas, que são a principal fonte de alimentação do rebanho, responsável por quase 90% da carne bovina e pela maior parte do leite produzido no país (SOUZA SOBRINHO et al., 2009). Aproximadamente 85% das áreas de pastagens cultivadas no país são ocupadas por espécies do gênero *Brachiaria*. Dentre elas, destacam-se as espécies *B. decumbens* por causa da boa adaptação a solos ácidos e de baixa fertilidade; *B. brizantha* com resistência à cigarrinha-das-pastagens; *B. ruziziensis* com alto valor nutritivo e *B. humidicola* com boa adaptação a solos ácidos, de baixa fertilidade e mal drenados.

Dentre os fatores para o sucesso de programas de melhoramento de *Brachiaria* destacaram-se a seleção de genótipos e os cruzamentos interespecíficos entre *B. decumbens* e *B. brizantha*. As duas espécies são apomíticas, o que dificulta a formação de híbridos, necessitando da duplicação de genótipos da *B. ruziziensis* para a realização dos cruzamentos e consequente geração de variabilidade genética (VALLE et al., 2010).

Os híbridos interespecíficos podem apresentar alta frequência de irregularidades meióticas. Anormalidades que ocorram durante a meiose podem levar à formação de gametas com um número de cromossomos não balanceado e em geral, inviável (VALLE, 2010).

A viabilidade do pólen pode ser uma forma de se verificar a irregularidades da meiose, logo, no presente trabalho objetivou-se a avaliação da viabilidade do pólen das plantas da espécie *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente pelo uso da colchicina.

## Material e Métodos

O experimento foi conduzido no laboratório de Genética Vegetal, na Embrapa Gado de Leite- Juiz de Fora, MG. Foram utilizadas 22 plantas de *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente por meio do tratamento com colchicina.

Após a duplicação do número cromossômico no laboratório de Genética Vegetal e manutenção das plantas na casa de vegetação, as mudas foram encaminhadas para o Campo Experimental de Santa Mônica (Valença, RJ), onde foram cultivadas de acordo com as recomendações para a cultura. Na época de florescimento da espécie foi realizada a coleta de inflorescências em diversos estádios de desenvolvimento de 22 genótipos tetraplóides, juntamente com as testemunhas *B. decumbens* e *B. brizantha* que são tetraploides e apomíticas.

As inflorescências foram armazenadas em béquer contendo apenas água no Laboratório de Genética Vegetal da Embrapa Gado de Leite. O pólen coletado das inflorescências foi utilizado para o preparo de lâminas de cada um dos 24 tratamentos seguindo metodologia apresentada por Timbo (2011). As lâminas foram fixadas com o corante de Alexander, que reage onde há plena atividade enzimática, indicada pela presença da enzima esterase. proporcionando coloração roxa ao pólen viável. O pólen inviável permanece verde ou roxo claro. Foram preparadas 3 lâminas por tratamento e após 24 horas procedeu-se a contagem de cinco campos aleatórios por lâminas, utilizando a objetiva de aumento de 20x. As médias de cada lâmina foram utilizadas para a obtenção da estimativa da porcentagem de pólen viável.

Os dados da porcentagem de pólen viáveis foram utilizados para realização da análise de variância considerando-se o delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Empregou-se o teste de Scott-Knott com 5% de probabilidade para comparar as médias de viabilidade do pólen dos tratamentos.

## Resultados e Discussão

Os resultados das análises de variância evidenciaram a existência de diferenças significativas entre as plantas, mostrando haver variação na viabilidade do pólen de plantas tetraploides de *B. ruziziensis* (Tabela 1). Resultados semelhantes foram obtidos por Staico et al (2012), Timbó et al (2011).

A viabilidade média dos grãos de pólen foi de 85,57%, e os tratamentos foram separados em três grupos distintos por meio do teste de Scott-Knott (Tabela 1).

As testemunhas classificadas no grupo a, *B. brizantha* e *B. decumbens*, apresentaram uma média de viabilidade do pólen de 59,45% que foi considerado como baixo valor de viabilidade. O grupo b, foi constituído por apenas um genótipo com média de 74,62% de viabilidade. Os outros 21 genótipos apresentaram as mais elevadas médias de viabilidade do pólen variando de 79,27% a 98,38%.

**Tabela 1.** Média da viabilidade de pólen dos genótipos de *B. ruziziensis* tetraploides agrupadas segundo o teste Scott- (0.05).

Tratamento	Média viabilidade de pólen (%)	Tratamento	Média viabilidade de pólen (%)
23 ( <i>B. brizantha</i> )	57,19 a	15	87,62 c
24 ( <i>B. decumbens</i> )	61,71 a	4	88,78 c
7	74,62 b	11	89,05 c
6	79,27 c	14	90,19 c
13	81,73 c	5	90,99 c
1	82,05 c	20	91,84 c
17	82,88 c	21	92,92 c
18	83,31 c	2	93,20 c
3	84,16 c	10	93,26 c
19	85,79 c	16	95,22 c
8	86,13 c	9	96,03 c
12	87,49 c	22	98,38 c
Média grupo a*		59,45	
Média grupo b*		74,62	
Média grupo c*		88,58	

\*Médias seguidas pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de probabilidade.

Com a duplicação do número de cromossomos da *B. ruziziensis*, todo o seu material genético também se duplica e o ideal é que esse processo não afete a viabilidade do pólen. Em função disto, ressalta-se a importância dos resultados obtidos neste trabalho, confirmado por resultados de Timbó (2011) e Staico et al (2012), mostrando que a viabilidade dos grãos de pólen das plantas tetraploidizadas é alto, semelhante às plantas diploides. Esse é um forte indício de que o processo meiótico não foi alterado com a duplicação cromossômica, reforçando as expectativas de que a produção de sementes viáveis dessas plantas será normal tanto em cruzamentos intra como interespecíficos.

Staico et al. (2012), também trabalhando com *B. ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente encontraram uma média alta para a viabilidade do pólen, 88,81%, e para as testemunhas, 57,83%. Os autores atribuíram a menor viabilidade do pólen das testemunhas, cultivares comerciais tetraploides de *B. brizantha* e *B. decumbens*, à apomixia. A apomixia acumula certos problemas comuns na divisão meiótica tais como: o acontecimento de cromossomos retardatários, assincronia nas divisões intermediárias e formação de micronúcleos e de políades em vez de tétrades ao final da divisão (FONSECA; SANTOS; MARTUSCELLO, 2010). E esses problemas levam a baixa viabilidade do pólen.

Timbó et al. (2011) trabalhando com plantas tetraploides de *B. ruziziensis* verificaram, que a porcentagem média da viabilidade dos grãos de pólen variou de 51,75 a 55,50% para as três plantas tetraploides avaliadas enquanto que o valor obtido para a planta de *B. ruziziensis* diploide, utilizada como testemunha, foi de 76,25%. A porcentagem média de viabilidade dos grãos de pólen observada nas plantas avaliadas foi de 53,67%. Esses valores da viabilidade de pólen são semelhantes àqueles observados por Goulart (2008), trabalhando com progênies de *B. ruziziensis* diploides. Evidencia-se, portanto, que a duplicação cromossômica das plantas de *B. ruziziensis* não afetou a sua meiose, avaliada por meio da viabilidade dos grãos de pólen produzidos.

## Conclusões

A viabilidade de pólen nas plantas de *B. ruziziensis* tetraploides foi elevada o que pode favorecer a obtenção de descendentes férteis em eventuais cruzamentos.

## Agradecimentos

Ao CNPq

## Literatura Citada

FONSECA, D. M.; SANTOS, M. E. R.; MARTUSCELLO, J. A. **Plantas forrageiras**. Viçosa: UFV, 2010. 13-18p.

GOULART, J. C. **Citogenética de acessos e progênies de *Brachiaria* (Poaceae)**. In: **Citogenética e anatomia foliar de acessos e progênies de *Brachiaria***. 2008. cap. 2, p. 22-36. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento de Plantas) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, MG.

SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F. J. S.; KOPP, M. M.; PEREIRA, A. V.; SOUZA, F. F. **Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite**. In: Evangelista AR and Souza FF (Eds.). **Forragicultura e Pastagem**. Lavras: UFLA, 2009. p. 98-111.

STAICO, A. C. P.; SALES, K. N.; CAMARINHA, F.; SOUZA SOBRINHO, F.; BENITES, F. R. G.; LEDO, F. J. S.; MACHADO, J. C. Viabilidade de pólen de plantas de *Brachiaria ruziziensis* tetraploidizadas artificialmente. In: **Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012**, Belém. II Congresso Brasileiro de Recursos Genéticos, 2012, Belém - PA, 2012.

TIMBO, A. L. O. **Duplicação cromossômica e identificação do nível de ploidia utilizando citometria de fluxo em *Brachiaria* ssp.** Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Lavras – UFLA, 100 p., 2011.

VALLE, C. B.; LENIS-MANZANO, S. J.; ARAUJO, A. C. G.; SANTANA, E. F.; CARNEIRO, V. T. C. Histologia da embriogênese somática induzida em embriões de sementes maduras de *Urochloa brizantha* apomítica. **Pesq. Agropec. Bras.**, Brasília, v.45, n.5, p. 435-441, 2010.

# Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite



## XIII Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

### Trabalhos:

#### **1. Resposta de *Cynodon nlemfuensis* ao nitrogênio fornecido por torta de girassol e nitrato de amônio**

Autores: Rafael Agostinho Ferreira, Pedro Henrique de Queirós Carlos, Antonioni Acacio Campos Moliterno, Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto Souza Sobrinho, Heloísa Carneiro, Bruna Dias

#### **2. Resposta de genótipos de *Cynodon* a diferentes concentrações de alumínio em solução nutritiva**

Autores: Pedro Henrique de Queirós Carlos, Rafael Agostinho Ferreira, Antonioni Acácio Campos Moliterno, Bruna Dias, Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Fausto de Souza Sobrinho, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fernando Teixeira Gomes

#### **3. Efeito da omissão de macronutrientes no desenvolvimento de *Cynodon nlemfuensis***

Autores: Antonioni Acácio Campos Moliterno, Rafael Agostinho Ferreira, Pedro Henrique de Queirós Carlos, Carlos Eugênio Martins, Wadson Sebastião Duarte Rocha, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto Sousa Sobrinho, Fernando Teixeiras Gomes, Bruna Dias

#### **4. Avaliação da citotoxicidade de membranas de álcool polivinílico com dióxido de titânio em fibroblastos bovinos**

Autores: Gustavo Terror Guelber, Mariana Machado, Humberto de Mello Brandão, Michele Munk Pereira, Juliana Carine Gern, Alessandro de Sá Guimarães, Guilherme Nunes de Souza, João Batista Ribeiro, Wanessa Araujo Carvalho

#### **5. Equação para predição de volume em função da pressão para o Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária**

Autores: Diego Charles de Almeida Santos, Sávio Augusto Toledo Moreira, Thierry Ribeiro Tomich, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos

#### **6. Avaliação do tempo de alimentação de fêmeas da raça Holandesa no pré parto**

Autores: Samara de Paula Lopes, Fernanda Moniz Silva, Felipe Nascimento Dantas, Bruno Campos de Carvalho, Cristiano Amâncio Vieira Borges, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, Jessica de Almeida Fernandes, Maria de Fátima Ávila Pires

**7. Consumo de leite fluido e fatores a ele associados em comunidades limítrofes rural-urbanas**

Autores: Renata de Fatima Liguori dos Santos, Marcio Roberto Silva, Guilherme Nunes de Souza, Letícia Scafutto de Faria

**8. Análise da Diversidade Genética na Raça Holandesa no Brasil**

Autores: Daiana de Souza Machado, Claudio Nápolis Costa, Glaucyana Gouvêa dos Santos, João Cláudio do Carmo Panetto, Pedro Ivo Lancellotta

**9. Variação na contagem de células somáticas e na produção de leite de rebanhos bovinos da raça holandesa de acordo com o isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite do tanque de expansão**

Autores:

**10. Banco de DNA da Embrapa Gado de Leite e Genotipagem dos Touros do Teste de Progênie da Raça Girolando**

Autores: Sula Abdallah Vieira Martins, Isabela Fonseca, Gisele Nogueira Fogaza, Felipe de Oliveira Vieira, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Isabela Gomes Barreto da Motta, Wagner Antônio Arbex, Katia Cristina Lage dos Santos, Marta Fonseca Martins, Marcos Vinicius Barbosa da Silva

**11. Avaliação da porcentagem de proteína bruta em progênies de *Cynodon nlemfuensis***

Autores: Bruna de Paula Dias, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto Souza Sobrinho, Larissa Figueiredo Aguiar Serra

**12. Avaliação do nível de expressão de genes constitutivos em úberes extracorpóreos perfundidos de vacas saudáveis abatidas**

Autores: Isabella Silvestre Barreto Pinto, Isabela Fonseca, Isabela Gomes Barreto da Mota, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos, Sula Abdallah Vieira Martins, Felipe de Oliveira, Gisele Nogueira Fogaça, Marta Fonseca Martins

**13. Padronização de metodologias para detecção de células viáveis de patógenos veiculados por produtos lácteos por meio de PCR em Tempo Real**

Autores: Felipe de Oliveira Vieira; Isabela Fonseca; Isabella Silvestre Barreto Pinto; Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos; Sula Abdallah Vieira Martins; Gisele Nogueira Fogaça; João Batista Ribeiro; Marta Fonseca Martins

**14. Padronização da detecção do caseínomacropeptídeo em leite bovino como indicativo de fraude pela adição de soro através da eletroforese microfluídica**

Autores: Fogaça, GN; Santos, ASO; Martins, SAV1; Vieira, FO; Motta, IGB; Fonseca, I; Pinto, ISB; Martins, MF

**15. Produtividade de forragem e porcentagem das folhas de populações de *Brachiaria ruziziensis***

Autores: Larissa Figueiredo Aguiar Serra, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Bruna de Paula Dias, Fausto Souza Sobrinho

**16. Emissão de metano entérico por novilhas leiteiras Holstein, Gyr e F1 Holandês x Gir**

*Autores: Maysa Andrade, Tainá Silvestre, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira*

## Resposta de *Cynodon nlemfuensis* ao nitrogênio fornecido por torta de girassol e nitrato de amônio

Rafael Agostinho Ferreira<sup>1</sup>, Pedro Henrique de Queirós Carlos<sup>1</sup>, Antonioni Acacio Campos Moliterno<sup>1</sup>, Carlos Eugênio Martins<sup>2</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Heloísa Carneiro<sup>2</sup>, Bruna Dias<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas pelo Centro de Ensino Superior CES/JF, Juiz de Fora/MG agostinhorafael@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora /MG

**Resumo:** A adubação orgânica é uma alternativa para redução de custos na agricultura, e também como destino de alguns resíduos da agroindústria. Portanto, o experimento teve como objetivo avaliar a resposta de *Cynodon nlemfuensis* cv. Estrela-Africana roxa a doses de nitrogênio fornecido por torta de girassol e nitrato de amônio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora/MG). Em um delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, em um esquema fatorial 5 x 5. Duas fontes (orgânica e mineral) foram utilizadas para fornecer o nitrogênio, torta de girassol (4,72% de N), e nitrato de amônio (35% de N). Foram definidas cinco doses de nitrogênio para avaliar a resposta de *Cynodon nlemfuensis* cv. Estrela roxa africana, 0, 50, 100, 200 e 400 kg/ha, os tratamentos foram definidos de forma que houvesse interação entre as duas fontes. Os resultados foram submetidos à análise de variância e à regressão ( $P < 0,05$ ). Foi verificado efeito residual do nitrogênio fornecido pela torta de girassol. Até a dose de 156 kg/ha de nitrogênio pode-se utilizar a adubação orgânica como fonte de nutriente.

**Palavras-chave:** Adubação orgânica, química, doses de nitrogênio, efeito residual do nitrogênio.

**Abstract:** The organic fertilizer is an alternative to reduce costs in agriculture, as well as the target of some agro-industrial residues. Therefore, the objective was to evaluate the response of *Cynodon nlemfuensis* to nitrogen supplied by sunflower meal and ammonium nitrate. The experiment was conducted in a greenhouse at Embrapa Dairy Cattle (Juiz de Fora/MG). In a complete randomized block design with four replications in a factorial 5 x 5. Two sources (organic and mineral) were used to provide nitrogen, sunflower meal (4.72 % N), and ammonium nitrate (35% N). Five doses of nitrogen were defined to evaluate the response of *Cynodon nlemfuensis*, 0, 50, 100, 200 and 400 kg/ha, the treatments were defined so that there was interaction between the two sources. The results were submitted to variance analysis and regression ( $P < 0.05$ ). Residual effect of nitrogen supplied by sunflower meal was verified. Until the dose of 156 kg/ha of nitrogen can be used as organic fertilizer nutrient source.

**Keywords:** organic chemistry, nitrogen, residual effect of nitrogen.

### Introdução

A adubação orgânica tem sido uma alternativa para redução de custos na agricultura, e também como destino de alguns resíduos da indústria e da propriedade. Este tipo de fertilização consiste na incorporação de matéria orgânica ao solo, melhorando alguns atributos físico-químicos e biológicos (LIMA et al., 2008). A América Latina produz mais de 500 mil toneladas de subprodutos e resíduos agroindustriais, sendo o Brasil responsável por mais da metade dessa produção. Desta forma, o aproveitamento destes subprodutos assume um papel economicamente importante, devido ao grande volume disponível, assim como a versatilidade de sua utilização, basicamente sob a forma de insumos para a alimentação animal (EVANGELISTA, 2008).



A falta de estudos a respeito da utilização destes sobreprodutos, como fonte de nitrogênio, evidencia a necessidade de estudos, principalmente no que diz respeito a pastagens. Portanto, o experimento teve como objetivo avaliar a resposta de *Cynodon nlemfuensis* cv. Estrela-Africana roxa à doses de nitrogênio fornecido por torta de girassol e nitrato de amônio.

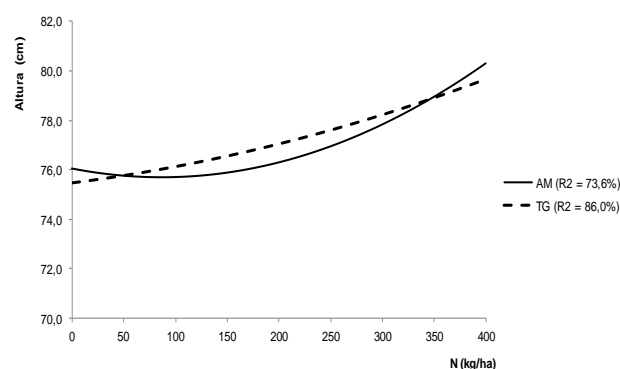
## Material e Métodos

O experimento foi conduzido em casa de vegetação na Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora/MG), em um delineamento em blocos ao acaso com quatro repetições, em um esquema fatorial 5 x 5.

Duas fontes (orgânica e mineral) foram utilizadas para fornecer o nitrogênio, torta de girassol (4,72 % de N), e nitrato de amônio (35% de N). Foram definidas cinco (5) doses de nitrogênio para ser avaliada a resposta de *Cynodon nlemfuensis* cv Estrela roxa africana, 0, 50, 100, 200 e 400 kg/ha, os tratamentos foram definidos de forma que houvesse interação entre as duas fontes. No caso da torta de girassol, a aplicação foi realizada em uma única parcela, pois é necessário incorporar no solo para mineralização. No caso da fonte mineral, a aplicação total foi dividida em seis parcelas. Foi realizado o plantio de uma muda da espécie, em vasos sem furos, contendo 4kg de material de solo. A irrigação foi realizada três vezes por semana sendo mantida a 60% da capacidade de campo. A cada 30 dias foram realizadas avaliações de altura e massa total. Os resultados foram submetidos à análise de variância e à regressão ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

Não houve resposta à adubação orgânica, considerando a massa total (Figura 2), mas foi verificado resposta no caso da altura (Figura 1), ao contrário da fonte mineral de nitrogênio. Pois, foi considerado o efeito residual da matéria orgânica da torta de girassol, enquanto na adubação mineral o nitrogênio foi adicionado em parcelas com intervalo de 30 dias (após cada corte).



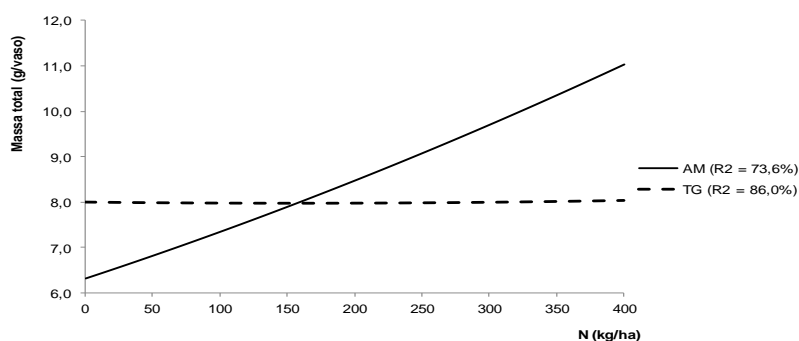
**Figura 1.** Altura de *Cynodon nlemfuensis* influenciada por doses crescentes de nitrogênio.

**Fontes utilizadas:** ureia (AM) –  $ALTURA = 0,000047N^2 + (-0,008169)N + 76,037892$  e torta de girassol (TG) –  $ALTURA = 0,000013N^2 + 0,0052610N + 75,481731$ .

Apesar do efeito residual da torta de girassol ter garantido desenvolvimento maior do que a adubação mineral nas doses mais baixas de nitrogênio (Figura 2), a adubação mineral seria a melhor opção em sistemas intensivos de produção. Quando comparado ao experimento anterior, onde o objetivo foi observar a produção de *B. ruziziensis*, a torta de girassol apresentou uma maior produção quando comparada a adubação não orgânica (Figuras 2 e 3). Portanto, considerando os resultados do segundo ano, pode-se inferir que a matéria orgânica foi decomposta e grande parte de seus nutrientes disponibilizados e utilizados pela cultura anterior (*Brachiaria ruziziensis*), quando a sua resposta foi superior à adubação com ureia (Figura 3). Neste caso, seria recomendada nova incorporação do

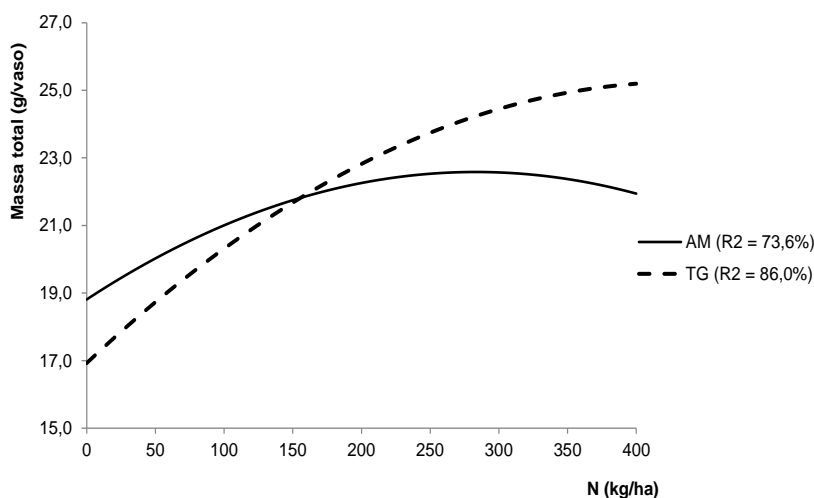
resíduo orgânico para ter o mesmo efeito do ano anterior (Figura 3). Porém, no caso de pastagem, a incorporação anual de matéria orgânica no solo não é viável.

Os resultados de altura demonstraram melhores incrementos em doses entre 50 e 350 kg/ha de N, quando foi utilizada a torta de girassol. Porém, no caso da massa total, o resíduo orgânico foi mais eficiente até a dose de 156 kg/ha de N. Desta forma, indicando que a forrageira somente respondeu à adubação química nas maiores doses de nitrogênio. Portanto, pode-se inferir que a utilização da torta de girassol até as doses de 156 kg/ha de nitrogênio tende a reduzir o custo com a adubação nitrogenada.



**Figura 2.** Produção de Massa Total (MTOTAL) de *Cynodon nlemfuensis* influenciada por doses crescentes de nitrogênio.

**Fontes utilizadas:** ureia (AM) –  $MTOTAL = -0,000005N^2 + 0,009779N + 6,3202$  e torta de girassol (TG) –  $MTOTAL = -0,000001N^2 + (-0,000001)N + 7,991732$ .



**Figura 3.** Produção de massa total (MTOTAL) de *B. ruziziensis*, influenciada por doses crescentes de nitrogênio.

**Fontes utilizadas:** ureia (AM) –  $MTOTAL = -0,000047N^2 + 0,026629N + 18,810669$  e torta de girassol (TG) –  $MTOTAL = -0,000044N^2 + 0,038270N + 16,926846$ .

## Conclusões

Foi verificado efeito residual do nitrogênio fornecido pela torta de girassol.

Até a dose de 156 kg/ha de nitrogênio pode-se utilizar a adubação orgânica como fonte de nutriente.

## Agradecimentos

À Embrapa, ao CNPq e à Fapemig pelo auxílio financeiro.

### **Literatura citada**

EVANGELISTA A. R. **Valor nutritivo de tortas e sementes de oleaginosas.** Lavras: UFLA/FAEPE, 402p. 2008.

LIMA, R.L.S., SEVERINO, L.S., ALBUQUERQUE, R.C., BELTRÃO, N.E.M., SAMPAIO, L.R. Casca e torta de mamona avaliados em vasos como fertilizantes orgânicos. **Caatinga**, v.21, p.102-106, 2008.

# **Resposta de genótipos de *Cynodon* a diferentes concentrações de alumínio em solução nutritiva**

## ***Cynodon* responses under different aluminum concentrations in nutritive solution**

Pedro Henrique de Queirós Carlos<sup>1</sup>, Rafael Agostinho Ferreira<sup>1</sup>, Antonioni Acácio Campos Moliterno<sup>1</sup>, Bruna Dias<sup>1</sup>, Carlos Eugênio Martins<sup>2</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>2</sup>, Fausto de Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fernando Teixeira Gomes<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Estudantes de Biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF – Av. Luz Interior, 345 – 36030-776 – Bairro Estrela Sul – Juiz de Fora/MG. peagah23@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, D.Sc. – Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 – Juiz de Fora/MG.

<sup>3</sup>Biólogo e Professor do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF – Av. Luz Interior, 345 – 36030-776 – Bairro Estrela Sul – Juiz de Fora/MG.

**Resumo:** A compreensão da variabilidade e da diversidade genética em relação à toxidez por alumínio é etapa indispensável em programas de melhoramento e de recursos genéticos visando identificar acessos que teriam maior chance de êxito na seleção para condições de estresse. O objetivo do trabalho foi estudar a resposta de genótipos de *Cynodon* sp. a diferentes concentrações de alumínio. O experimento foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Gado de Leite. Após a brotação em substrato comercial, as plântulas foram transferidas para vasos plásticos com capacidade para 2 L de solução nutritiva, acrescida de doses de alumínio (0, 30, 60 e 90 mg/L). Constatou-se que existe variabilidade genética entre os acessos de capim-estrela para a tolerância a toxidez por alumínio. Os atributos relacionados com a raiz foram os que melhor contribuíram para a divergência genética. A dose de 30 mg/L foi considerada ideal para a seleção de genótipos de *Cynodon* sp. As raízes se mostraram mais sensíveis ao alumínio do que a parte aérea.

**Palavras-chave:** *Cynodon nlemfuensis*, Genética vegetal, Melhoramento de forrageiras, Produção de forragem.

**Abstract:** The variability and genetic diversity knowledge about aluminum toxicity is necessary in breeding programs and genetic resources programs to identify accessions that in hybrid combinations had higher probability of success in selecting for stress conditions. The objective was evaluated the response of different genotypes of *Cynodon* sp. to aluminium concentration. This experiment was done in greenhouse at Embrapa Dairy Cattle. After the regrowth of forage in commercial substrate, seedlings were transferred to plastic pots with a capacity of 2 L of nutrient solution in addition of aluminum doses (0, 30, 60 e 90mg/L). There is genetic variability among accessions of star grass for aluminum toxicity tolerance. The attributes related with the root were the best that contributed to genetic divergence. The 30 mg/L dose was considered ideal for selection of *Cynodon* sp. Genotypes. The roots are more sensitive to aluminum than the shoot.

**Keywords:** *Cynodon nlemfuensis*, plant genetics, forage breeding, forage production.

## **Introdução**

A maioria dos solos brasileiros apresenta baixa fertilidade e problemas de acidez e toxidez por alumínio. No caso das pastagens, que normalmente ocupam áreas marginais, esses problemas são ainda mais sérios (MARTINS et al., 2010). A alta concentração de alumínio nos solos é, portanto, um dos principais fatores limitantes ao desenvolvimento

das plantas (KOCHIAN et al., 2005), afetando diretamente os processos fisiológicos e metabólicos da grande maioria das espécies cultivadas.

Existe variabilidade no comportamento em condições de estresse causado pelo alumínio. Entre as plantas forrageiras destacam as gramíneas do gênero *Cynodon* sp., em função de se adaptarem ao clima tropical e subtropical, com alto potencial produtivo, elevado valor nutritivo e excelente aceitabilidade pelos animais (EVANGELISTA et al., 2000).

A compreensão da variabilidade existente e a avaliação da diversidade genética em relação ao alumínio tóxico auxiliam os programas de melhoramento e de recursos genéticos na identificação de acessos tolerantes ao alumínio tóxico.

O objetivo foi estudar a resposta de genótipos de *Cynodon* sp. a concentrações de alumínio tóxico.

## **Material e Métodos**

O experimento foi realizado em casa de vegetação da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG. Foram avaliados 10 genótipos de *Cynodon* sp. sob quatro doses de alumínio. Foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso, em um esquema fatorial 10 x 4, com três repetições. Foram produzidas mudas pelo enraizamento de gemas em substrato comercial. Após o enraizamento, as plântulas foram selecionadas e transplantadas para vasos plásticos, com dois litros de solução nutritiva de Clark, 1975.

Os 10 genótipos foram submetidos a quatro doses de alumínio (0, 30, 60 e 90 mg/L), ou seja, 40 tratamentos. A solução nutritiva foi trocada semanalmente. A cada troca o valor de pH era ajustado para 4,5. Após 30 dias, o sistema radicular foi seccionado da parte aérea. Depois de terem os comprimentos (PA e Raiz) e o volume (Raiz) medidos e as massas (Folha e colmo) determinadas, os materiais foram submetidos à secagem, 55 °C durante 48 h. Os incrementos foram calculados pela diferença entre os valores final (após 30 dias) e inicial. Foram avaliados os incrementos no comprimento da parte aérea (IPA) e das raízes (IRAIZ), incrementos de volume (IVOL), relações folha/colmo (RFC), relação entre raiz e parte aérea (RRAIZPA) e a massa seca total (MTOTAL). Os resultados foram submetidos à análise de variância e quando necessário ao teste de médias (Scott-Knott, 1974),  $P < 0,05$ .

## **Resultados e Discussão**

Foram observadas diferenças entre os acessos para todas as características. Portanto, conforme foi verificado também por Dawson et al. (2008), é possível ter sucesso em programas de melhoramento com o uso de germoplasma tradicional, sobretudo para condições de estresse.

Quando não havia alumínio em solução (Tabela 1), não foi verificada dominância de algum dos genótipos, considerando todos os atributos avaliados. Por exemplo, os maiores valores de IPA foram observados para JIGGS e PORTO RICO, enquanto que os maiores valores de IR foram observados para TIFTON 68 e 85.

**Tabela 1.** Resultados de incremento no crescimento da parte aérea (IPA) e da raiz (IR) e no volume radicular (IVOL), além das relações folha/colmo (RFC) e raiz/parte aérea (RRAIZPA) e da produção total (MTOTAL) em solução com 0 mg/L de alumínio.

Genótipos	IPA	IRAIZ	IVOL cm <sup>3</sup>	RFC	RRAIZPA	MTOTAL g
	----- cm -----	----- cm -----				
G.E. Branca	68 c	15 c	8c	0,41a	0,40a	6c
Florona	112 b	15 c	20b	0,36a	0,42a	12b
Jiggs	141 a	33 b	17b	0,32a	0,26b	17a
Porto Rico	160 a	5 d	7c	0,34a	0,16b	10b
Florakirk	41 c	28 b	23a	0,49a	0,66a	8c
G.E.Roxa	96 b	16 c	9c	0,39a	0,16b	7c
Coast Cross	48 c	9 d	7c	0,62a	0,40a	5d
Tifton 68	54 c	44 a	28a	0,51a	0,06b	17a
Florico	69 c	31 b	11c	0,49a	0,37a	2d
Tifton 85	54 c	50 a	13c	0,53a	0,25b	12b

Valores médios com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1974), P < 5%.

A raiz foi a primeira a sofrer efeito negativo da presença de alumínio. Portanto, os atributos IR e IVOL podem ser utilizados como definidores para a escolha da dose de alumínio que seria considerada para selecionar os materiais mais tolerantes. Neste caso, à dose 30 mg/L (Tabela 2) foi a indicada, pois não há variabilidade destes atributos nas doses de 60 e 90 mg/L (Tabelas 3 e 4).

**Tabela 2.** Resultados de incremento no crescimento da parte aérea (IPA) e da raiz (IR) e no volume radicular (IVOL), além das relações folha/colmo (RFC) e raiz/parte aérea (RRAIZPA) e da produção total (MTOTAL) em solução com 30 mg/L de alumínio.

Genótipos	IPA	IRAIZ	IVOL cm <sup>3</sup>	RFC	RRAIZPA	MTOTAL g
	----- cm -----	----- cm -----				
G.E. Branca	54 b	3 b	4b	0,53a	0,74a	1b
Florona	42 b	17 a	7b	0,32a	0,31b	2b
Jiggs	62 b	3 b	7b	0,28a	0,56b	5a
Porto Rico	54 b	6 b	8b	0,22a	0,29b	7a
Florakirk	52 b	13 a	7b	0,43a	0,97a	8a
G.E.Roxa	102 a	1 b	6b	0,42a	0,24b	6a
Coast Cross	3 c	6 b	9b	0,69a	0,33b	8a
Tifton 68	39 b	7 b	14a	0,43a	0,40b	9a
Florico	75 a	1 b	5b	0,48a	0,26b	3b
Tifton 85	40 b	8 b	12a	0,48a	0,29b	7a

Valores médios com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1974), P < 5%.

Ao considerar a produção de massa seca por vaso, foi observado que os genótipos sofreram muito com a presença do alumínio. No caso dos materiais mais produtivos sem a presença do alumínio (JIGGS e TIFTON 68, Tabela 1), quando foram manejados em solução com 30 mg/L de Al ocorreu queda na produção de 2 a 3 vezes (Tabela 2). Sendo que alguns materiais tiveram redução de até 10 unidades, indicando sensibilidade ao alumínio tóxico.

**Tabela 3.** Resultados de incremento no crescimento da parte aérea (IPA) e da raiz (IR) e no volume radicular (IVOL), além das relações folha/colmo (RFC) e raiz/parte aérea (RRAIZPA) e da produção total (MTOTAL) em solução com 60 mg/L de alumínio.

Genótipos	IPA ----- cm	IRAIZ -----	IVOL cm <sup>3</sup>	RFC	RRAIZPA	MTOTAL g
G.E. Branca	41 c	2a	5a	0,50a	0,60b	1b
Florona	35 c	6a	5a	0,38a	0,65b	1b
Jiggs	60 c	2a	5a	0,36a	0,66b	2b
Porto Rico	163 a	2a	5a	0,29a	0,29c	5a
Florakirk	41 c	2a	8a	0,57a	1,38a	1b
G.E.Roxa	92 b	7a	8a	0,16a	0,14c	5a
Coast Cross	15 d	1a	6a	0,64a	0,21c	1b
Tifton 68	22 d	8a	6a	0,37a	0,58b	4a
Florico	47 c	1a	7a	0,58a	0,35c	3b
Tifton 85	23 d	1a	11a	0,48a	0,24c	4a

Valores médios com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1974),  $P < 5\%$ .

**Tabela 4.** Resultados de incremento no crescimento da parte aérea (IPA) e da raiz (IR) e no volume radicular (IVOL), além das relações folha/colmo (RFC) e raiz/parte aérea (RRAIZPA) e da produção total (MTOTAL) em solução com 90 mg/L de alumínio.

Genótipos	IPA ----- cm	IRAIZ -----	IVOL cm <sup>3</sup>	RFC	RRAIZPA	MTOTAL g
G.E. Branca	73 b	2a	6a	1,54a	0,63a	3a
Florona	55 c	2a	5a	0,40b	0,70a	2a
Jiggs	102 a	1a	5a	0,14c	0,11b	3a
Porto Rico	109 a	1a	5a	0,04c	0,15b	4a
Florakirk	52 c	3a	6a	0,49b	0,59a	2a
G.E.Roxa	117 a	3a	5a	0,26c	0,12b	4a
Coast Cross	16 d	4a	5a	0,41b	0,54a	3a
Tifton 68	21 d	8a	3a	0,42b	0,72a	6a
Florico	36 c	1a	8a	0,57b	0,40a	3a
Tifton 85	18 d	7a	9a	0,44b	0,46a	3a

Valores médios com letras iguais não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott (1974),  $P < 5\%$ .

## Conclusões

A dose de 30 mg/L foi considerada ideal para a seleção de genótipos de *Cynodon* sp.

As raízes se mostraram mais sensíveis ao alumínio do que a parte aérea.

## Agradecimentos

À Embrapa, ao CNPq e à Fapemig pelo auxílio financeiro.

## Literatura Citada

CLARK, R.B. Characterization of phosphatase in intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.

DAWSON J.C. MURPHY, K.M. JONES, S.S. Decentralized selection and participatory approaches in plant breeding for low-input systems. **Euphytica** 160:143–154, 2008.

FALCONER, D.S. **Introdução à genética quantitativa**, Trad. SILVA, M.A. & SILVA, J.C. Viçosa, UFV. Imprensa Universitária, 1987. 279p.

KOCHIAN, L.V. PINEROS, M.A. HOEKENGA, O.A. The Physiology, Genetics and Molecular Biology of Plant Aluminum Resistance and Toxicity. **Plant and Soil**, v. 274, n. 1, 175-195, 2005.

MARTINS, C.E.; SOUZA SOBRINHO, F.; GOMES, F.T.; ROCHA, W.S.D. BRIGHENTI, A.M. Tolerância à toxidez por alumínio em capim-elefante. **Pesquisa Aplicada & Agrotecnologia**. n. 3, n. 1, p. 95-101, 2010.

EVANGELISTA, A.R.; DE LIMA, J.A.; BERNARDES, T.F. Avaliação de Algumas Características da Silagem de Gramínea Estrela Roxa. **Revista Brasileira de Zootecnia**. Vol.29, n. 4, 2000.



## **Efeito da omissão de macronutrientes no desenvolvimento de *Cynodon nlemfuensis***

Antonioni Acácio Campos Moliterno<sup>1</sup>, Rafael Agostinho Ferreira<sup>1</sup>, Pedro Henrique de Queirós Carlos<sup>1</sup>, Carlos Eugênio Martins<sup>2</sup>, Wadson Sebastião Duarte Rocha<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fausto Sousa Sobrinho<sup>2</sup>, Fernando Teixeiras Gomes<sup>3</sup>, Bruna Dias<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Estudantes de Biologia do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF – Av. Luz Interior, 345 – 36030-776 – Bairro Estrela Sul – Juiz de Fora/MG  
antonioni.moliterno@bol.com.br

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, D.Sc. – Rua Eugênio do Nascimento, 610 – Bairro Dom Bosco – 36038-330 – Juiz de Fora/MG

<sup>3</sup>Biólogo e Professor do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF – Av. Luz Interior, 345 – 36030-776 – Bairro Estrela Sul – Juiz de Fora/MG

**Resumo:** Os capins do gênero *Cynodon* vêm sendo utilizados para formação de pastagens, pois se adaptam bem as áreas de climas tropicais. Em relação à disponibilidade de nutrientes no solo, o *Cynodon* sp., em geral, têm suas necessidades nutricionais maiores em relação a outros capins, evidenciando as características requeridas para o experimento, que teve como objetivo avaliar o capim estrela (*Cynodon nlemfuensis*) em solução nutritiva na ausência e presença dos nutrientes, nitrogênio, fósforo e potássio. O experimento foi conduzido em casa de vegetação, Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora/MG). Foi avaliado o efeito da ausência e presença dos nutrientes, nitrogênio, fósforo e potássio, e a interação entre eles no desenvolvimento da forrageira. Foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso, em um esquema fatorial 2 x 2 x 2, com quatro repetições. Foram avaliados os incrementos no comprimento da parte aérea (IPA) e da raiz (IR) e do volume radicular (IVOL), e calculada a relação folha/colmo (RFC). Os resultados foram submetidos à análise de variância ( $P < 0,05$ ). O nitrogênio aumentou o comprimento da parte aérea das plantas e sua relação folha/colmo independente da ausência ou presença de fósforo e potássio na solução. Somente o nitrogênio influenciou o aumento do volume radicular. O nitrogênio e o potássio, juntos, responderam pelo maior crescimento da raiz. Quando o nitrogênio estava presente em solução, a adição de fósforo reduziu o crescimento radicular.

**Palavras-chave:** *Cynodon*, grama estrela, macronutrientes, nutrição mineral.

**Abstract:** The grasses of the genus *Cynodon* have been used for cattle pasture, as well adapted tropical climates areas. Regarding the availability of nutrients in the soil, *Cynodon* sp. generally have their highest nutritional needs compared to other grasses, presenting the characteristics required for the experiment, which aimed to assess the star grass (*Cynodon nlemfuensis*) solution nutrient in the absence and presence of nutrients, nitrogen, phosphorus and potassium. The experiment was conducted in a greenhouse, Embrapa Dairy Cattle (Juiz de Fora/MG). The effect of the absence and presence of nutrients, nitrogen, phosphorus and potassium, and their interaction in the development of forage has been reported. One design was used in randomized blocks in a factorial 2 x 2 x 2 design with four replications. Increments were evaluated in shoot length (IPA) and root (IR) and root volume (IVOL), and calculated leaf/stem ratio (RFC). The results were subjected to analysis of variance ( $P < 0.05$ ). Nitrogen increased the shoot length of plants and their leaf/stem regardless of the absence or presence of phosphorus and potassium in the solution. Only the nitrogen influenced the increase of the root volume. Nitrogen and potassium, together, accounted for a bigger root growth. When nitrogen was present in solution, the addition of phosphorus reduced root growth.

**Keywords:** *Cynodon*, star grass, macronutrients, mineral nutrition.

### **Introdução**

A gestão de uma propriedade rural é essencial, para garantir melhor aproveitamento das culturas a serem implantadas. No caso da forrageira, tende-se à preferência a que mais se

adapta ao clima, a topografia, a disponibilidade de nutrientes no solo entre outros aspectos (BARBOSA et al., 2002).

A nutrição mineral é de alta relevância, a disponibilidade de macro e micronutrientes na quantidade exigida potencializa a produção. O nitrogênio atua na formação de compostos orgânicos, tais como as proteínas, aminoácidos e na clorofila, o fósforo age nas membranas de fosfolípidios, empregados como fonte de energia para (ATP) e nos ácidos nucleicos, e o potássio exerce a função no controle osmótico das células, fotossíntese e na translocação de fotossintetizados (SOUZA & FERNANDES, 2006, AZAR, 2007). Outra situação que pode influenciar no desenvolvimento vegetal é a interação entre os nutrientes. Desta forma, o objetivo deste experimento foi avaliar o capim estrela (*Cynodon nlemfuensis*) em solução nutritiva na ausência e presença dos nutrientes, nitrogênio, fósforo e potássio.

## MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi conduzido em casa de vegetação, Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora/MG). Foram utilizados genótipos comerciais do capim estrela (*Cynodon nlemfuensis*). Foi avaliado o efeito da ausência e presença dos nutrientes, nitrogênio, fósforo e potássio, e a interação entre eles no desenvolvimento da forrageira. Foi utilizado um delineamento em blocos ao acaso, em um esquema fatorial 2 x 2 x 2, com quatro repetições. Sendo oito tratamentos: N1P1K0, N1P0K1, N0P1K1, N1P0K0, N0P0K1, N0P1K0, N0P0K0, N1P1K1, considerando o valor um (1) para presença e zero (0) para ausência do nutriente.

Durante o experimento (outubro e novembro de 2013) as temperaturas máxima e mínima foram registradas (Figura 1).

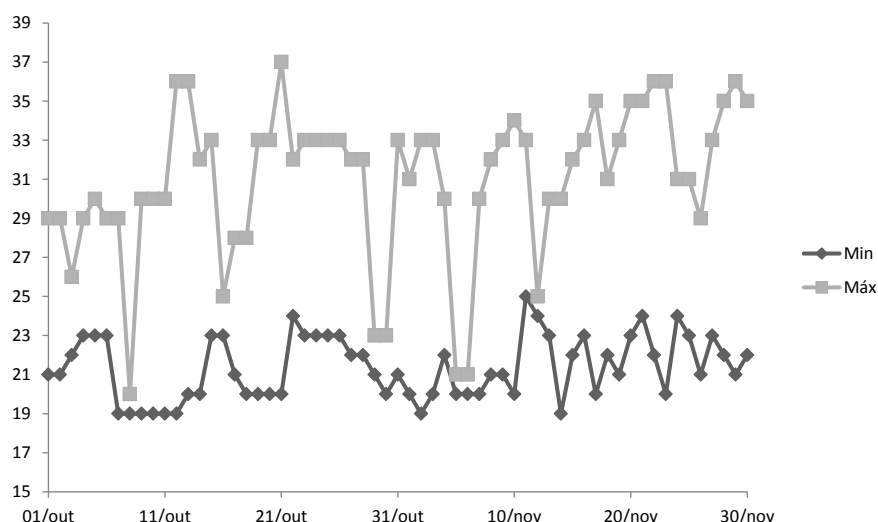


Figura 1. Temperaturas máximas e mínimas registradas nos meses de outubro e novembro de 2013.

As plantas foram colocadas em vasos plásticos pintados com tinta preta betuminosa e alumínica e internamente revestidos com uma sacola preta para evitar a passagem de luz e inibir o desenvolvimento de algas. Antes de serem colocadas nos vasos foram mensurados os valores iniciais dos comprimentos da parte aérea e da raiz e volume radicular. Durante os primeiros sete dias as plantas cresceram em solução nutritiva de Clark (1975) aerada, porém com metade da concentração de nutrientes recomendada. Após sete dias, promoveu-se semanalmente a troca da solução nutritiva de acordo com o tratamento definido. Ao término do experimento as plantas foram retiradas dos vasos, o sistema radicular, juntamente com a parte aérea e volume da raiz foram medidos e a massa determinada e acondicionados em sacos de papel para secagem (96 horas a 55 °C). Foram avaliados os incrementos no comprimento da parte aérea (IPA) e da raiz (IR) e do volume radicular (IVOL), expressa pela diferença entre as medições final e inicial. Foi também calculado a relação folha/colmo (RFC). Os resultados foram submetidos à análise de variância ( $P < 0,05$ ).

## Resultados e Discussão

O nitrogênio aumentou o comprimento da parte aérea das plantas e sua relação folha/colmo independente da ausência ou presença de fósforo e potássio na solução (Tabela 1), devido, provavelmente, a sua importância na formação de compostos orgânicos como a clorofila. As plantas cresceram mais na presença de N e P, pois o fósforo está no componente estrutural de membranas do DNA e envolvido na transferência de energia via ATP, ADP. No caso do potássio, a presença de N influenciou de forma negativa o crescimento das plantas, uma vez que o potássio age no equilíbrio osmótico da célula, sua ação pode ter desestabilizado a transpiração.

**Tabela 1.** Efeito da interação entre os nutrientes NPK no incremento do comprimento da parte aérea (IPA) e na relação folha/colmo (RFC).

IPA	P0	P1	K0	K1	RFC	P0	P1	K0	K1
N0	34,4 B,a	31,1 B,a	38,3 A,a	27,7 B,a		0,20 B,a	0,26 B,a	0,27 B,a	0,20 B,a
N1	47,0 A,b	71,3 A,a	48,8 A,b	69,4 A,a		0,33 A,a	0,37 A,a	0,37 A,a	0,34 A,a

Médias seguidas por letras iguais (maiúscula - coluna e minúscula - linha) não diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

As avaliações feitas pelos incrementos da raiz mostraram que, N e K, juntos responderam pelo maior crescimento da raiz, porém somente o N influenciou o aumento do volume radicular (Tabela 2).

Quando o nitrogênio estava presente em solução, a adição de fósforo reduziu o crescimento radicular (Tabela 2), pois os dois podem estar presentes na forma aniônica, ocorrendo assim uma competição entre eles pelos sítios de absorção.

**Tabela 2.** Efeito da interação entre os nutrientes NPK no incremento do comprimento do sistema radicular (IR) e na volume (IVOL).

IR	P0	P1	K0	K1	IVOL	P0	P1	K0	K1
N0	3,6 A,a	2,8 A,a	5,0 A,a	1,3 B,b		9,0 A,a	7,7 B,b	8,3 B,b	8,4 A,a
N1	3,7 A,a	2,4 A,b	2,1 B,b	4,0 A,a		11,5 A,a	10,8 A,a	11,3 A,a	11,0 A,a

Médias seguidas por letras iguais (maiúscula - coluna e minúscula - linha) não diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

## Conclusões

O nitrogênio aumentou o comprimento da parte aérea das plantas e sua relação folha/colmo independente da ausência ou presença de fósforo e potássio na solução. Somente o nitrogênio influenciou o aumento do volume radicular. O nitrogênio e o potássio, juntos, responderam pelo maior crescimento da raiz. Quando o nitrogênio estava presente em solução, a adição de fósforo reduziu o crescimento radicular.

## Agradecimentos

À Embrapa, ao CNPq e à Fapemig pelo auxílio financeiro.

## Literatura Citada

AZAR, G. S. Avaliação de cultivares de *Cynodon* nos períodos seco e chuvoso, na região norte do Piauí/Gynna Silva Azar. Teresina. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí. 2007. 2007.48 f.

CLARK, R. B. Characterization of phosphatase in intact maize roots. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 23, p. 458-460, 1975.

BARBOSA, F. P. et., al. Infra-Estrutura, Embrapa Gado de leite. Sistema de Produção, 4. 2002. Acessado em 05 de fevereiro de 2014. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteSudeste/infra/10.html>> .

SOUSA, R S., FERMANDES, S. M. **Nutrição mineral de plantas**/editor Manlio Silvestre Fernandes.  
- Viçosa, MG : Sociedade Brasileira de Ciência do Solo, 2006. [viii], 432p. : il. algumas col.; 26 cm.

# **Avaliação da citotoxicidade de membranas de álcool polivinílico com dióxido de titânio em fibroblastos bovinos**

## **Citotoxicity evaluation of alcohol polivilinic with titanium dioxide membranes on bovine fibroblasts**

Gustavo Terror Guelber<sup>1</sup>, Mariana Machado<sup>2</sup>, Humberto de Mello Brandão<sup>3</sup>, Michele Munk Pereira<sup>4</sup>, Juliana Carine Gern<sup>3</sup>, Alessandro de Sá Guimarães<sup>3</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>3</sup>, João Batista Ribeiro<sup>3</sup>, Wanessa Araujo Carvalho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Ciências Biológicas pelo CES/JF – Bolsista da Fapemig – e-mail: gguelber@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Graduando em Ciências Biológicas pelo CES/JF – Bolsista da Embrapa

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – e-mail: humberto.brandao@embrapa.br

<sup>4</sup>Pós-doutoranda na Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** Nos últimos anos, as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) têm sido utilizada em diversos estudos e setores da indústria devido às suas propriedades físico-químicas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de membranas de dióxido de titânio em células do tipo fibroblasto bovino. Foram testadas membranas de Álcool Polivilínico (PVA, sigla no inglês), membranas de PVA + dióxido de titânio e membranas controle positivo (*Positive RM-A ZDEC Polyurethane Film – Hatano Research Institute, FDSC*) e negativo (*Negative RM-C High Density Polyethylene Film – Hatano Research Institute, FDSC*). As membranas foram adicionadas em poços contendo fibroblastos e foram tiradas fotografias nos períodos de 0, 24 e 48 horas de incubação. Após 48 horas, os poços foram tripsinizados e as células contadas utilizando o método de exclusão por *Trypan Blue* para avaliar o número de células viáveis e não-viáveis em cada poço. Nos poços contendo as membranas de PVA e de PVA + TiO<sub>2</sub> houve 75% e 60% de morte celular, respectivamente. Nos poços contendo membranas controle positivo houve 100% de morte celular, e nos poços contendo membranas controle negativo não houve morte, sugerindo que as membranas de PVA e PVA + TiO<sub>2</sub> são tóxicas às células. Observou-se que o tamanho das membranas para o experimento deve ser padronizado e a quantidade de líquido presente em cada poço deve ser menor, de modo que as membranas permaneçam fixas nas placas, permitindo uma melhor qualidade nos resultados.

**Palavras-chave:** Citotoxicidade, Dióxido de Titânio, Fibroblastos, Nanopartículas.

**Abstract:** In the latest years, titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles have been used in many studies and industries fields due to its physicochemical properties. The experiment described in this abstract was performed to assess the cytotoxicity of Polyvinyl Alcohol + Titanium Dioxide membranes (PVA + TiO<sub>2</sub>) on bovine fibroblasts cell type. For that, PVA, PVA + TiO<sub>2</sub>, positive control and negative control membranes were tested. The membranes were added to wells with cells and pictures were taken using the optical microscope's cam in the periods of 0, 24 and 48 hours of incubation. After 48 hours, the wells were trypsinized and counted using the Trypan Blue exclusion method to assess the number of viable and non-viable cells on each well. On each well containing PVA and PVA + TiO<sub>2</sub>, there was 75% and 60% cell death, respectively. In those with positive control membrane, there was 100% cell death and in the well with negative control membrane, there was no cell death, suggesting that PVA and PVA + TiO<sub>2</sub> membranes are toxic to these cells. Was observed that the size of the membranes must be standard and the amount of liquid added on each well must be lower, making sure that membranes will adhere in the plate and stay affixed, raising the results quality.

**Keywords:** Cytotoxicity, Titanium Dioxide, Fibroblasts, Nanoparticles.

## Introdução

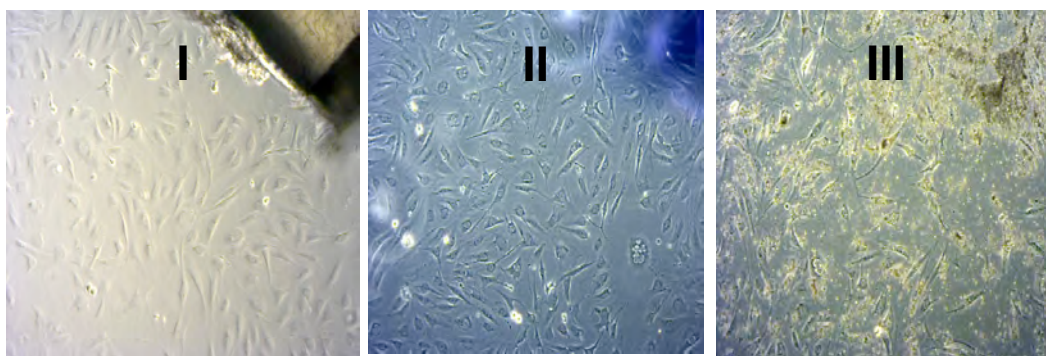
Devido à sua estabilidade química, propriedades não alérgicas, não irritantes, proteção ultravioleta, dentre outras, as nanopartículas de dióxido de titânio têm sido largamente utilizadas em diversos campos da ciência e da indústria. Entretanto, muitos estudos e testes ainda devem ser feitos de modo a verificar os efeitos tóxicos destas partículas, tanto no meio ambiente como para os humanos (LIU; LIN e ZHAO, 2013), além da interação delas com outros fatores químicos e físicos, porém existem poucos trabalhos publicados na literatura sobre tais efeitos. Nos últimos anos, entretanto, diversos estudos foram realizados de modo a verificar a toxicidade destas nanopartículas em diversos tipos de células e órgãos. Diferentes modelos animais submetidos a múltiplas exposições de rotas de administração, incluindo inalação, injeção intravenosa, exposição dérmica, dentre outras, foram intensivamente testados nestes estudos (SHI et al., 2013). Este ensaio teve como objetivo avaliar a citotoxicidade de membranas contendo álcool polivinílico (PVA, sigla no inglês), PVA + TiO<sub>2</sub>, e membranas controle positivo e negativo, em células do tipo fibroblasto bovino, animal 3446.

## Material e Métodos

Para realizar o experimento foram utilizadas placas de cultivo celular de 6 poços, estufa de cultivo celular, fluxo laminar com luz UV, microscópio ótico com câmera imbutida, pipetadores manuais, ponteiros descartáveis, béquer para descarte de material, meio de cultura DMEM completo – Gibco, Tripsina – EDTA *solution* – Amresco *biosystems*, *Trypan Blue*, câmara de Neubauer, PBS 10x concentrado, centrifuga, aquecedor banho Maria, membranas de PVA, membranas controle positivo e negativo e membranas de PVA + TiO<sub>2</sub>. Os materiais não biológicos foram esterilizados em luz UV por 15 minutos antes de iniciar o experimento. Foram plaqueados 100 µL de meio de cultura DMEM completo contendo  $0,3 \times 10^6$  células em cada poço, somados a 900 µL de meio de cultura DMEM completo, totalizando 1 mL de líquido em cada poço. Em seguida, as placas foram colocadas na estufa de cultivo celular à 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> e deixadas até atingirem total confluência nos poços. Posteriormente, as membranas foram cortadas em quadrados de aproximadamente 0,5 cm x 0,5 cm e cuidadosamente adicionadas nas placas, uma membrana por poço. Em seguida, foram tiradas 4 fotografias de cada poço, uma para cada aumento do microscópio, e em seguida, as placas foram colocadas novamente na estufa de cultivo celular. Após 24 horas de incubação das membranas, foram tiradas mais 4 fotografias de cada poço, e novamente após 48 horas. Os poços foram tripsinizados após 48 horas e as células centrifugadas. O sobrenadante foi descartado e o pélate foi suspenso em 1 mL de meio DMEM completo, para contagem das células viáveis e não viáveis utilizando o *Trypan Blue*. Foi feita uma diluição das células em um tubo Falcon utilizando 10 µL contendo células e 10 µL contendo *Trypan Blue*, e em seguida foram colocados 10 µL da solução na câmara de Neubauer para contagem.

## Resultados e Discussão

Após contagem das células na câmara de Neubauer, foi observado que houve 75% e 60% de morte celular nos poços contendo as membranas de PVA e PVA + TiO<sub>2</sub>, respectivamente. Nos poços contendo a membrana controle positivo, houve 100% de morte celular como esperado, e nos poços contendo a membrana controle negativo não houve morte celular, indicando que as membranas de PVA e PVA + TiO<sub>2</sub> são tóxicas aos fibroblastos bovinos (Figura 1), embora um outro estudo tenha observado que as nanopartículas de TiO<sub>2</sub> (5, 10, 25, and 100 nm; anatase) causaram baixa toxicidade em macrófagos de ratos (células do tipo MH-S) (ZHANG et al., 2012), sugerindo que mais testes devam ser realizados para que se tenha conhecimento sobre os níveis de toxicidade dessas nanopartículas nos diversos tipos celulares.



**Figura 1.** Micrografia de fibroblastos bovinos cultivados in vitro por 48 horas. I: Controle negativo sem nanopartículas, com 0% de morte celular; II: Fibroblastos com membrana de PVA, com 75% de morte celular; III: Fibroblastos com membrana de PVA +  $\text{TiO}_2$ , com 60% de morte celular.

### Conclusões

Os resultados obtidos demonstraram que houve morte celular nos poços contendo as membranas de PVA e PVA +  $\text{TiO}_2$ , nas proporções de 75% e 60%, respectivamente, sugerindo que, nas condições testadas, a membrana de PVA e as nanopartículas de  $\text{TiO}_2$  são tóxicas à esse tipo celular. Devido à escassez de trabalhos publicados sobre os procedimentos para utilização das nanopartículas e sua toxicidade nos diversos tipos celulares, os ensaios foram feitos com base em adaptações de procedimentos utilizados para ensaios com outras substâncias químicas, logo se faz necessário a realização de mais testes, de modo a padronizar os procedimentos envolvidos na utilização de nanomateriais em cultivo *in vitro*.

### Agradecimentos

Os autores agradecem à Fapemig, à Rede Agronano e à Capes Rede Nanobiotec – Brasil (Edital CAPES04/CII-2008).

### Literatura Citada

LIU, K.; LIN, X.; ZHAO, J. Toxic effects of the interaction of titanium dioxide nanoparticles with chemicals or physical factors. **International Journal of Nanomedicine**, v. 8, p. 2509-2520, 2013 .

SHI, H.; MAGAYE, R.; CASTRANOVA, V.; ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, p.15, 2013.

ZHANG, J.; SONG, W.; GUO, J.; ZHANG, J.; SUN, Z.; LI, L.; DING, F.; GAO, M. Cytotoxicity of different sized  $\text{TiO}_2$  nanoparticles in mouse macrophages. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 6, p. 523-533, 2012.

# **Equação para predição de volume em função da pressão para o Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária<sup>1</sup>**

## **Equation for prediction of volume as function of pressure for the Laboratory of in vitro Gas Production of the Multi-use Complex on Livestock Bioefficiency and Sustainability**

Diego Charles de Almeida Santos<sup>2</sup>, Sávio Augusto Toledo Moreira<sup>2</sup>, Thierry Ribeiro Tomich<sup>3</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>3</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>3</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Experimento componente do projetos “RumenGases” e “Nutrição de Precisão para gado de leite em condições tropicais: exigências nutricionais, métricas de bioeficiência alimentar e fenótipos qualificados”

<sup>2</sup>Aluno de Medicina Veterinária – Unipac/Juiz de Fora. Bolsista PIBIC da Embrapa Gado de Leite. E-mails: diego.ovidio@gmail.com, savioaugusto2005@hotmail.com

<sup>3</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. E-mails: thierry.tomich@embrapa.br, luiz.gustavo@embrapa.br, fernanda.machado@embrapa.br, mariana.campos@embrapa.br

**Resumo:** Objetivou-se gerar equação para predição do volume de gases em função da pressão para o Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária. Foi seguido o protocolo da técnica in vitro semi-automática de produção de gases adaptado para utilização de frascos de fermentação com capacidade para 50 mL em substituição aos de 160 mL empregados na técnica original. Procedeu-se reduções proporcionais à do volume dos frascos para o peso de amostra e volumes de meio tampão e inóculo de rúmen. Foram gerados 900 dados de pressão (registrados em transdutor) e de volume de gases (coletados em seringa graduada). Esses dados foram submetidos a um estudo de correlação e análise de regressão. Os registros de pressão variaram de 0,000 a 7,131 psi, os volumes de 0,00 a 21,00 mL de gases e a correlação entre pressão e volume foi alta ( $r = 0,99$ ) e significativa ( $P < 0,01$ ). Observou-se resposta linear do volume de gases em função da variação de pressão e o volume foi estimado somando-se a constante de 0,135874 mL ao valor da pressão multiplicado por 2,94412. Com esta equação, a variação no volume de gases foi quase totalmente explicada pela variação na pressão ( $r^2 = 0,99$ ). Os resultados indicam que a equação obtida neste estudo pode ser utilizada para a predição do volume de gases a partir da pressão registrada pelo transdutor com a devida acurácia exigida para os estudos de cinética ruminal conduzidos com a técnica in vitro de produção de gases.

**Palavras-chave:** avaliação de alimentos para animais, cinética ruminal, equação de regressão, técnicas *in vitro*.

**Abstract:** This study was carried out to generate the equation for predicting volume as a function of pressure of gas for the Laboratory of in vitro Gas Production of the Multi-use Complex on Livestock Bioefficiency and Sustainability. It was followed the protocol of the semi-automated in vitro gas production technique adapted for use in the fermentation flasks of 50 mL instead of 160 mL employees on the original technique. Proportional reductions according the reduction of volume of the flasks were performed for sample weight, and for buffer and rumen inoculum volumes. Nine hundred data for pressure (recorded on transducer) and gas volume (collected in graduated syringe) were generated. These data were subjected to a study of correlation and regression analysis. The pressure records ranged from 0.000 to 7.131 psi, volumes of gas from 0.00 to 21.00 mL and the correlation between pressure and volume was high ( $r = 0.99$ ) and significant ( $P < 0.01$ ). There was a linear response of the gas volume due to changes in pressure and volume was estimated by adding to the constant value of 0.135874 mL pressure multiplied by 2.94412. With this equation, the change in volume of gas was almost completely



explained by variations in pressure ( $r^2 = 0.99$ ). The results indicate the equation obtained in this study can be used to predict the volume of gas from the pressure recorded by the transducer with the accuracy required for studies of ruminal kinetics conducted with the in vitro gas production technique.

**Keywords:** animals food evaluation, *in vitro* techniques, regression analysis, rumen kinetics.

## Introdução

A técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases (*Reading Pressure Technique* – RPT) foi implantada em laboratórios brasileiros de pesquisa em nutrição animal no início dos anos 2000. Desde então, se mostrou um importante instrumento nos estudos realizados para a avaliação de alimentos para ruminantes, especialmente para os estudos sobre estratégias de manejo e aqueles inseridos em programas de seleção e melhoramento de forrageiras (TOMICH et al., 2003; GUIMARÃES JÚNIOR et al., 2008; SOUZA et al., 2011). Seguindo o princípio das técnicas *in vitro*, a RPT apresenta, entre as vantagens frente às metodologias *in vivo* e *in situ* de avaliação de alimentos para ruminantes, a necessidade de menor trabalho experimental, menor custos para execução e a possibilidade de avaliação de grande número de alimentos em um único experimento. Simulando a digestão no rúmen e capaz de estimar o aproveitamento dos alimentos pelos ruminantes, esta técnica experimental vem sofrendo adaptações para permitir avaliar as emissões de gases associação aos impactos ambientais derivados da pecuária ( $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$ ) a partir da fermentação dos substratos testados, facilitar a segregação dos resíduos de incubação e ser executada com menor quantidade de reagentes em relação ao protocolo original da técnica. No Laboratório de Produção de Gases instalado no Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária na Embrapa Gado de Leite a RPT foi devidamente adaptada e já estão sendo desenvolvidos estudos sobre a produção de  $\text{CO}_2$  e  $\text{CH}_4$  *in vitro*. No mesmo laboratório, esta técnica também já se encontra validada para o emprego das sacolas de filtragem F57 (*Ankom Technology*), com a finalidade de facilitar a segregação dos resíduos de incubação. Contudo, o emprego da RPT neste laboratório ainda necessita das equações de predição do volume de gases em função dos dados de pressão observados em transdutor para sua execução com uso de frascos de fermentação de menor capacidade volumétrica, que permitem o emprego menores quantidades de amostra, reagentes e inóculo de rúmen.

Objetivou-se com a execução deste trabalho gerar uma equação para predição do volume de gases em função da pressão para o Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária empregando frascos de fermentação com capacidade de 50 mL em substituição aos frascos de 160 mL descritos no protocolo original da RPT.

## Material e Métodos

Setenta e duas amostras do volumoso (silagem de milho) do concentrado e da dieta (60% de volumoso e 40% de concentrado) utilizadas em experimento para determinação das exigências nutricionais de bovinos leiteiros foram incubadas por duas até 36 horas conforme o protocolo da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases descrito por Maurício et al. (1999). Contudo, procedeu-se a adaptação para utilização de frascos de fermentação com capacidade volumétrica de 50 mL em substituição aos de 160 mL empregados para a execução da técnica pelo protocolo original. Procedeu-se reduções proporcionais à do volume dos frascos de fermentação para o peso de amostra e volumes de tampão e inóculo de rúmen. Desta forma, foram utilizadas amostras de 0,320 g, 30,0 mL de meio de cultura (tampão) e 3,5 mL de inóculo de rúmen.

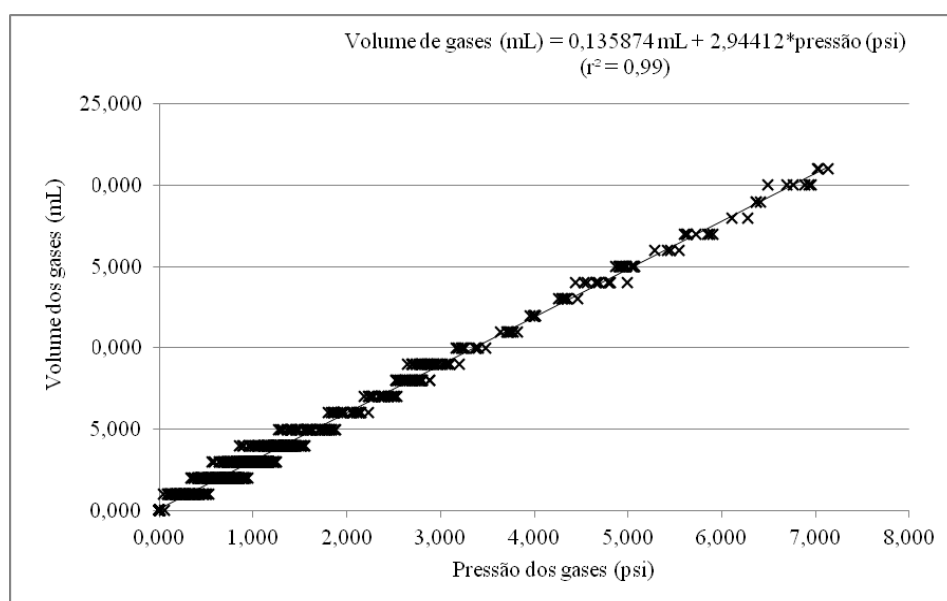
A pressão originada dos gases acumulados na parte superior dos frascos foi medida utilizando-se um transdutor de pressão conectado a uma válvula de três saídas

para controle da direção do fluxo dos gases. A primeira saída foi conectada a uma agulha (25 mm x 0,7 mm), a segunda foi conectada ao transdutor de pressão e a terceira a uma seringa graduada de 60 mL. A pressão exercida pelos gases no interior dos frascos foi lida em marcador digital do transdutor a partir da inserção da agulha na rolha dos frascos de fermentação. O volume de gases acumulados foi aferido com uso da seringa até no momento em que a pressão registrada no marcador chegasse a zero, confirmando a retirada total dos gases. Dessa forma, para uma mesma amostra e tempo de incubação obtiveram-se os dados de pressão e volume dos gases de incubação. Foram gerados 900 dados úteis de pressão e volume de gases.

Os dados de pressão e volume foram submetidos à análise estatística descritiva empregando-se o Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG). Ainda utilizando o SAEG, foi estimado o coeficiente de correlação entre pressão e volume pelo coeficiente de correlação de Pearson. Adicionalmente, foi feita análise de regressão para estabelecer a equação de relação do volume de gases produzidos em função da pressão observada no marcador do transdutor, tendo o volume de gases como variável dependente e a pressão como variável independente. Para esta análise empregou-se o procedimento “Regressão polinomial” também do disponível no SAEG.

## Resultados e Discussão

Com os 900 dados pressão e volume obtidos a partir da fermentação das 72 amostras de volumoso, concentrado e dieta gerou-se a seguinte equação: Volume de gases (mL) = 0,135874 mL + 2,94412\*pressão (psi),  $r^2 = 0,99$  (Figura 1). O valor do coeficiente de determinação ( $r^2$ ) próximo a um indica que a variação no volume de gases foi quase totalmente explicada pela variação na pressão na equação, demonstrando a adequação da regressão obtida para a predição acurada do valor de volume de gases a partir dos registros de pressão.



**Figura 1.** Relação entre pressão registrada em transdutor e volume de gases produzidos pela fermentação de amostras incubadas *in vitro* no Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária.

Foi observada ampla variação nas leituras de pressão e de volume de gases, com valores variando de 0,000 a 7,131 psi e de 0,0 a 21,0 mL, respectivamente. A correlação entre os valores de pressão e de volume foi alta ( $r = 0,99$ ) e significativa ( $P < 0,01$ ). Os dados de pressão ficaram situados em uma faixa considerada apropriada por Maurício et al. (2003) para o desenvolvimento da equação de relação entre pressão e volume de gases para esta técnica experimental, já que, segundo esses autores, valores de pressão acima de 7,0 psi acarretariam instabilidade na relação entre as variáveis. Além disso, a

grande amplitude observada nos resultados é considerada adequada para o desenvolvimento desse tipo de equação, porque, desta forma, pode-se recomendar o uso da equação gerada para estimar o volume de gases (variável dependente) em qualquer estudo onde os resultados obtidos para a variável independente (pressão) estejam situados entre os valores mínimo e máximo dos dados de pressão obtidos no atual estudo. Desta forma, a equação gerada a partir desses dados pode ser recomendada para ser utilizada com segurança em estudos desenvolvidos no Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária utilizando procedimentos experimentais análogos ao do presente estudo e que apresentem leituras de pressão entre 0,000 e 7,100 psi.

Adicionalmente, ressalta-se que a ampla variação observada nos atuais resultados está de acordo com a seleção das amostras de alimentos utilizada no experimento. Esta seleção foi delineada visando obter alimentos com grande variação em termos do valor nutritivo e que apresentassem ampla variação no grau de fermentação pela técnica de produção de gases. Desta forma, a equação obtida pela regressão dos dados de pressão e volume poderia ser considerada de uso universal para os novos experimentos conduzidos no Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária, recém-instalado na Embrapa Gado de Leite.

### **Conclusões**

Para os experimentos realizados no Laboratório de Produção de Gases do Complexo Multiusuário de Bioeficiência e Sustentabilidade da Pecuária empregando frascos de fermentação com capacidade volumétrica de 50 mL, os resultados indicam que a equação obtida no presente estudo pode ser utilizada para a predição do volume de gases a partir da pressão registrada no marcador do transdutor de pressão com a devida segurança e acurácia exigidas para os procedimentos experimentais de cinética ruminal conduzidos com a técnica *in vitro* de produção de gases

### **Agradecimentos**

Os autores são gratos ao Sistema Embrapa de Gestão – SEG, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – Fapemig e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq pelo financiamento das atividades de pesquisa e concessão das bolsas.

### **Literatura Citada**

GUIMARÃES JÚNIOR, R; GONÇALVES, L.C.; MAURÍCIO, R.M., PEREIRA, L.G.R; TOMICH, T.R.; PIRES, D.A.A.; JAYME, D.G.; SOUZA, L.F. Cinética de fermentação ruminal de silagens de milheto. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, p.1174-1180, 2008.

MAURÍCIO, R.M.; MOULD, F.L.; DHANOA, M.S.; OWEN, E.; CHANNA, K.S.; THEODOROU, M.K. A semi-automated *in vitro* gas production technique for ruminant feedstuff evaluation. **Animal Feed Science and Technology**, v.79, p.321-330, 1999.

MAURÍCIO, R.M.; PEREIRA, L.G.R.; GONÇALVES, L.C.; RODRIGUEZ, N.M. Relação entre pressão e volume para implantação da técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases na avaliação de forrageiras tropicais. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.216-219, 2003.

SOUZA, L.F.; MAURÍCIO, R.M.; GONÇALVES, L.C.; BORGES, I. MOREIRA, G.R. Cinética de fermentação ruminal *in vitro* da forrageira *Brachiaria brizantha* cv. Marandu em sistema silvipastoril. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p.382-391, 2011.

TOMICH, T.R.; GONÇALVES, L.C.; MAURÍCIO, R.M.; PEREIRA, L.G.R.; RODRIGUES, J.A.S. Composição bromatológica e cinética de fermentação ruminal de híbridos de sorgo com capim-sudão. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, p.747-755, 2003.

# **Avaliação do tempo de alimentação de fêmeas da raça Holandesa no pré parto**

## **Feeding behavior of cows Holstein before calving**

Samara de Paula Lopes<sup>2</sup>, Fernanda Moniz Silva<sup>3</sup>, Felipe Nascimento Dantas<sup>3</sup>, Bruno Campos de Carvalho<sup>4</sup>, Cristiano Amâncio Vieira Borges<sup>4</sup>, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto<sup>4</sup>, Jessica de Almeida Fernandes<sup>3</sup>, Maria de Fátima Ávila Pires<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Financiada pela Fapemig e CNPq

<sup>2</sup>Bolsista CNPq, Juiz de Fora/MG. e-mail: samaravetlopes@gmail.com

<sup>3</sup>Bolsista Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

<sup>4</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

<sup>5</sup>Analista Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

**Resumo:** O comportamento ingestivo de bovinos é constituído de uma rotina diária, principalmente de duração e frequência da alimentação. O trabalho propôs avaliar o comportamento alimentar de vacas holandesas pluríparas e primíparas em pré parto, alojadas em piquete maternidade. O comportamento foi avaliado por 15 dias, iniciando se logo após o fornecimento do alimento pela manhã. Foram anotados em uma planilha o número e a hora de início e o término da ingestão do alimento. A frequência média diária de ingestão de alimentos, ou seja, o número de visitas ao cocho/dia no pré-parto foi de 3,65 vezes para pluríparas e 3,97 para primíparas e duração média por episódio de alimentação foi de 40 min. Os resultados obtidos revelam a tendência de múltíparas alimentarem por menor tempo diariamente, permanecendo maior tempo no cocho e visitando o cocho com menor frequência quando comparado a primíparas. Os resultados encontrados enfatizam a importância de se conhecer o comportamento ingestivo de vacas pluríparas e primíparas no pré parto.

**Palavras-chave:** alimentação, bem estar, comportamento, pré parto.

**Abstract:** The feeding behavior of cattle consists of a daily routine, especially duration and frequency of feeding. The study aimed to evaluate the feeding behavior of primiparous and multiparous lactating Holstein cows in pre birth, housed in a paddock motherhood. The behavior was evaluated for 15 days, starting up after the supply of food in the morning. The number and time of commencement and termination of food ingestion. Average daily frequency of food intake, ie were recorded in a spreadsheet, the number of visits to the trough/day pre -partum was 3.65 times and for pluriparous 3.97 for primiparous and average duration per episode of power was 40min . The results show a tendency to multiparous feed for less time each day, staying longer in the trough and the trough visiting less frequently when compared to gilts. The results emphasize the importance of understanding the feeding behavior of primiparous and multiparous lactating cows in the pre delivery.

**Keywords:** nutrition, welfare, behavior, before calving.

## **Introdução**

O estudo do comportamento ingestivo dos bovinos possibilita o ajuste do manejo alimentar para obtenção do melhor desempenho (MENDONÇA et al., 2004). Estes animais permanecem, em média, quatro horas e meia por dia se alimentando com variação de uma hora até seis horas (BURGER et al., 2000) e são estimulados a procurar o alimento nos momentos da oferta do mesmo (DAMASCENO et al., 1999). O comportamento alimentar no período pré-parto foi monitorado Huzzey et al. (2007) que encontraram uma duração de três horas a três horas e meia por dia no tempo despendido com a ingestão de alimento no cocho, observou que até três dias antes do parto as vacas se alimentam por um período de 180 a 200 minutos por dia. Este tempo é reduzido para 120 minutos quando

se aproxima do parto (1<sup>o</sup> e 2<sup>o</sup> dia pré parto). O monitoramento do comportamento ingestivo, nesta fase, pode representar uma estratégia valiosa para melhorar o bem estar dos animais, diminuindo a incidência de doenças no pós parto e reduzir os as perdas econômicas (GÓNZALES et al., 2008). Considerando a importância do pré parto para a futura lactação e reprodução do gado de leite, este trabalho propôs avaliar o comportamento ingestivo de vacas pluríparas e primíparas holandesas, semi confinadas em piquete maternidade, recebendo suplementação no cocho.

## Material e Métodos

O estudo foi conduzido entre os meses de maio a junho de 2013 no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB). Durante 15 dias foi monitorado o comportamento ingestivo de 18 vacas holandesas, sendo 12 pluríparas e 6 primíparas, mantidas em piquete maternidade em regime de semi confinamento a partir do 30<sup>o</sup> dia antes do parto previsto. Os animais receberam, em torno das 09:00 horas da manhã, uma dieta completa, fornecida na base de 23 Kg de matéria natural/animal e distribuída em cocho de madeira com uma área de cocho entre 50 a 60 cm/animal. A partir do momento que o alimento foi depositado no cocho iniciou se a observação. A colheita dos dados foi realizada por três observadores treinados e alojados em lugar estratégico para não interferir no comportamento do grupo. Foram anotados em uma planilha o número e a hora em que cada animal iniciava e finalizava o consumo de alimento no cocho. O período de observação durou , em média , sete horas por dia. Para a avaliação do comportamento alimentar, a distribuição dos horários de ingestão de alimento foi estimada via histograma de frequências e via suavização não paramétrica de densidade por *kernel*. Foram calculadas ainda, considerando as 12 vacas pluríparas e as 6 primíparas, as médias/dia do tempo de alimentação, da duração de cada refeição e da frequência de visitas. As análises foram realizadas no *software* estatístico R (R CORE TEAM, 2013).

## Resultados e Discussão

As variáveis relacionadas ao comportamento ingestivo de múltíparas e primíparas apresentadas na Tabela 1 mostram que, ao longo do dia, as primíparas despendem, em média, 25 min a mais do tempo se alimentando que as múltíparas. Informação semelhante foi relatada Huzzey et al. (2007) que observaram um maior tempo de alimentação para primíparas em decorrência, provavelmente, da maior lentidão na ingestão de alimento desta categoria animal. O tempo total diário despendido com alimentação, independente da categoria animal, foi de 02 h 30 min. que está dentro da variação 01:30 hs a 03:35 hs de citada por Huzzey et al. (2007). No entanto, os resultados de Burger et al. (2000) mostraram que vacas confinadas permanecem se alimentando por um período 4,5 horas. Esta diferença pode estar relacionada aos diferentes sistemas e metodologias adotados nos dois experimentos. As demais variáveis duração média de cada episódio de alimentação e número médio de visitas ao cocho embora apresentem uma tendência de variação entre múltíparas e primíparas (Tabela1), seria necessário uma maior amostragem para se tornarem conclusivas. Feito esta ressalva, podemos observar que as primíparas tendem a um maior número de visitas ao cocho e que cada visita apresenta uma tendência de menor duração comparada ao comportamento das múltíparas (Tabela 1). Estes resultados podem ser atribuídos ao comportamento social dos bovinos uma vez que as primíparas são frequentemente deslocadas de áreas de alimentação pelas múltíparas (HUZZEY et al., 2007), tornando, o tempo de ingestão mais curto e aumentando o número de vistas ao cocho para que se complete o consumo adequado de matéria seca. O pico de alimentação (maior número de animais se alimentando ao mesmo tempo) ocorreu em torno de 09 h 30 min hs 30 min, imediatamente após o fornecimento da dieta completa. Neste momento todos os animais se aproximavam do cocho e iniciavam a ingestão de alimento por um período médio de 55 min. sendo 51 min. para as múltíparas e 55 min. para as primíparas. Segundo Damasceno et al. (1999), esta é considerada a principal refeição do dia e este comportamento é esperado em animais confinados ou semi confinados. Foram

observados também dois picos menores de alimentação, em torno de 11:45 hs e 14:00 hs, além de outros episódios menos significativos distribuídos ao longo do dia. Comportamento semelhante foi descrito por Silva et al. (2005).

**Tabela 1.** Tempo médio despendido alimentação diário (hr/dia), tempo médio por episódio (min/dia) e número de visitas/dia.

	Multíparas		Primíparas
	Geral	Total	Total
Tempo total por dia (hr/dia)	2,30	2,25	2,50
Tempo total por episódio (min/dia)	40,00	40,42	38,48
Número de visitas	3,8	3,65	3,97

## Conclusões

A avaliação do comportamento ingestivo de pluríparas e primíparas indicou uma tendência na variação dentro do tempo despendido para a alimentação, na frequência de visitas ao cocho e no tempo gasto para alimentação. É necessário durante o período do pré parto manter vacas multíparas e primíparas em diferentes piquetes maternidade ou aumentar a área de cocho com o objetivo de maximizar o consumo de alimentos, melhorar o bem estar e minimizar as perdas econômicas.

## Agradecimentos

Apoio financeiro Fapemig e CNPq

## Literatura Citada

- BURGER, P. J.; et al. Comportamento ingestivo em bezerros holandeses alimentados com dietas contendo diferentes níveis de concentrado. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 29, n. 1, p. 236-242. 2000. ISSN 1516-3598.
- DAMASCENO, J. C.; JUNIOR, F. B.; TARGA, L.A. Respostas comportamentais de 15 vacas holandesas com acesso a sombra constante ou limitada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v.34, p.709-715, 1999.
- GONZALEZ, L. A. TOLKAMP, B. J. COFFEY M. P. FERRET, A. KYRIAZAKIS, I. Changes in Feeding Behavior as Possible Indicators for the Automatic. Monitoring of Health Disorders in Dairy Cows. **Journal of Dairy Science** Vol. 91 No. 3, p. 1017-1028, 2008.
- HUZZEY, J. M.; VEIRA, D. M.; WEARY, D. M.; Von KEYSERLINGK, M. A. G. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. **Journal of Dairy Science**, Vol. 90, NO. 7, p. 3220-3233, 2007.
- MENDONÇA, S.S.; CAMPOS, J.M.S.; VALADARES FILHO, S.C. et al. Consumo, digestibilidade aparente, produção e composição do leite e variáveis ruminais em vacas leiteiras alimentadas com dietas à base de cana-de-açúcar. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.33, n.2, p.481-492, 2004.
- SILVA, R. R; SILVA, F. F; CARVALHO, G. P. Comportamento ingestivo de novilhas mestiças de holandês x zebu confinadas. **Archivos de Zootecnia**., v. 54, n. 205, p. 76. 2005.

# **Consumo de leite fluido e fatores a ele associados em comunidades limítrofes rural-urbanas<sup>1</sup>**

## **Consumption of liquid milk and factors associated with it in neighboring communities rural-urban**

Renata de Fatima Liguori dos Santos<sup>2</sup>, Marcio Roberto Silva<sup>3</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>3</sup>, Letícia Scafutto de Faria<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Projeto financiado pelo CNPq

<sup>2</sup>Estagiária Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite

**Resumo:** O leite é fonte de vários nutrientes importantes para o ser humano, porém o consumo de lácteos no Brasil ainda é baixo. Assim, o objetivo deste estudo foi estimar as quantidades de consumo de leite fluido e avaliar os fatores a ele associados em cinco regiões limítrofes rural-urbanas da cidade de Juiz de Fora, MG. Foi construído um modelo multivariado para estimar as quantidades de consumo de leite fluido e avaliar os fatores a ele associados. Os dados foram obtidos por meio de entrevista. A variável local de residência apresentou associação significativa com o consumo de leite, sendo que os entrevistados que residiam nas localidades de Monte Verde ( $p < 0,1$ ), Humaitá ( $p < 0,05$ ) e Torreões ( $p < 0,05$ ), apresentaram maior consumo de leite do que aqueles que residiam na localidade de Filgueiras. A idade foi negativamente associada ( $p < 0,001$ ) ao consumo de leite. A renda *per capita* teve uma associação direta ( $p < 0,001$ ), apresentando um aumento no consumo de 8,88 mL/dia para cada aumento de um salário mínimo na renda. O número de moradores por residência apresentou uma associação inversa, sendo que cada morador a mais na residência impactou numa redução de 0,37 mL/dia. O hábito de fumar também teve uma associação inversa, mostrando que os indivíduos que não fumavam consumiam, em média, 21,71 mL/dia a mais de leite fluido que os indivíduos que fumavam 10 ou mais cigarros por dia. Finalmente, o consumo de leite nesta população esteve aquém das recomendações, em especial entre adolescentes e adultos.

**Palavras-chave:** consumo de leite, fatores associados, idade, número de moradores por domicílio, renda, tabagismo.

**Abstract:** The milk is a source of several important nutrients for the human being, but the consumption of dairy products in Brazil is still low. Therefore, the objective of this study was to estimate the quantity of consumption of liquid milk and evaluate the factors associated with it in five regions neighboring rural-urban city of Juiz de Fora, MG. A multivariate model was constructed to estimate the quantities of consumption of liquid milk and to evaluate the factors associated with it. The data were obtained by means of interview. The variable local of residence showed significant association with the consumption of milk, being that the interviewees who lived in towns of Monte Verde ( $p < 0,1$ ), Humaitá ( $p < 0,05$ ) and Torreões ( $p < 0,05$ ), had higher consumption of milk than those who lived in the locality of Filgueiras. Age was negatively associated ( $p < 0,001$ ) the consumption of milk. *Per capita* income had a direct association ( $p < 0,001$ ), showing an increase in consumption of 8,88 mL/day for each increase of one minimum wage income. Number of inhabitants per residence showed an inverse association, being that for each homeowner to more in residence impacted in a reduction of 0,37 mL/day. The habit of smoking also had a inverse association, showing that individuals who do not smoked, drank on average, 21,71 mL/day to over milk fluid that those who smoked 10 or more cigarettes per day. Finally, the consumption of milk in this population was far short of the recommendations, in particular among adolescents and adults.

**Keywords:** age, associated factors, income, milk consumption, number of household members, smoking.



## Introdução

Estudos indicam que o consumo de produtos lácteos em Kg *per capita* tem experimentado crescimento no Brasil, ampliando de 88,7, em 1987, para 124,6 em 2007, um incremento de 28,8% (FAO, 2013).

Bilhões de pessoas consomem leite e derivados todo dia no mundo, os quais são uma fonte vital de nutrição para essas pessoas (FAO, 2013). Segundo Miller et al. (2001), os alimentos lácteos são fontes preferenciais de cálcio devido à absorção relativamente alta deste elemento quando comparada com a de alguns outros alimentos, sendo difícil suprir suas recomendações diárias sem o consumo do leite e seus derivados. Outras pesquisas também sugerem que uma dieta pobre em lácteos será pobre em nutrientes, uma vez que além do cálcio, o leite contém vários outros nutrientes essenciais como vitamina D, proteína, potássio, vitamina A, vitamina B12, fósforo, riboflavina, niacina, entre outros (GOLDBARG, 2007). Entretanto, não existem recomendações globais para consumo de leite ou produtos lácteos. Muitos países têm desenvolvido em nível nacional as suas orientações dietéticas, que são baseadas em disponibilidade de alimentos locais, custo, estado nutricional, padrões de consumo e hábitos alimentares. Por causa das diferenças entre esses fatores, as recomendações variam muito. A maior parte dos países recomenda pelo menos uma porção de leite diariamente, com alguns países recomendando até três porções por dia (FAO, 2013).

Para orientar e encorajar a implementação de políticas públicas para o aumento de consumo de leite é preciso conhecer não somente a frequência do consumo da população, mas também os fatores associados ao seu consumo. Dessa forma, o presente estudo teve por objetivo estimar as quantidades de consumo de leite fluido e avaliar os fatores a ele associados em cinco localidades limítrofes rural-urbanas de Juiz de Fora, MG.

## Material e Métodos

### Local, população e desenho do estudo

Foi realizado um estudo de corte transversal para estimar as quantidades de consumo de leite fluido e avaliar os fatores a ele associados. A população do estudo foi constituída por habitantes de cinco localidades limítrofes rural-urbanas de Juiz de Fora, MG. Os dados foram obtidos por meio de entrevista com 723 pessoas residentes de 192 domicílios. O levantamento foi concluído em 2007.

### Variáveis do estudo

O estudo teve como variável resposta a quantidade de leite fluido consumida por dia, uma variável contínua. As variáveis explicativas do estudo foram local de residência, sexo, número de moradores no domicílio, nível de escolaridade, renda *per capita*, idade, tipo de leite consumido, consumo de refrigerante e hábito de fumar. As variáveis explicativas foram classificadas como categóricas e/ou numéricas, de acordo com as análises realizadas.

### Análises estatísticas

Foram empregados modelos lineares univariados e multivariados, utilizando o modelo Tobit, para avaliar a relação entre possíveis variáveis explicativas e as quantidades de consumo de leite fluido. As variáveis que foram associadas ao consumo de leite fluido na análise univariada com nível de significância  $p < 0,20$  foram consideradas para análise multivariada, usando o método "backward", sendo de 0,05 o nível de significância considerado neste modelo.

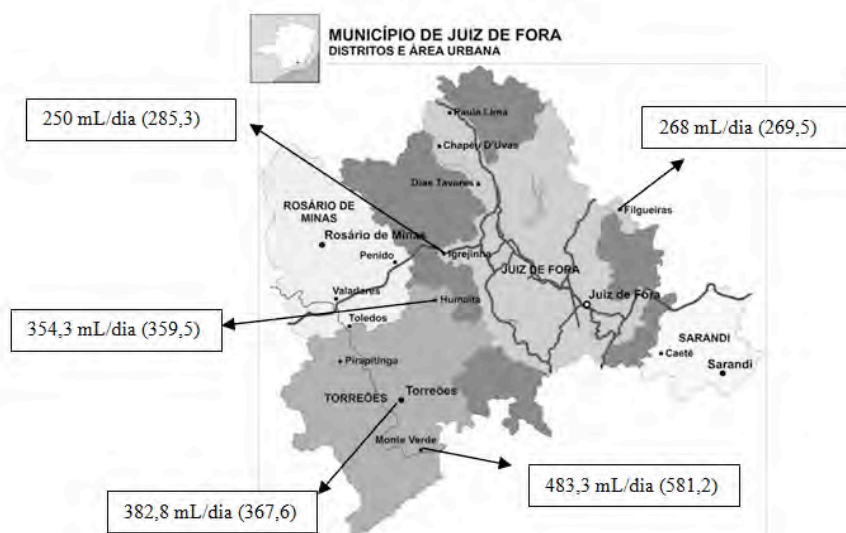
## Resultados e Discussão

Dos 723 entrevistados, 135 indivíduos (34,9%) não consumiam leite e a mediana de consumo *per capita* de leite fluido foi de 200 mL/dia.

A Figura 1 apresenta as médias e os respectivos desvios padrão do consumo de leite fluido *per capita*, em mL/dia, nos locais do estudo.

A Tabela 1 apresenta a análise multivariada de regressão linear para consumo de leite fluido. A variável local de residência apresentou associação significativa com o consumo de leite fluido, entrevistados que residiam nas localidades de Monte Verde ( $p < 0,1$ ), Humaitá ( $p < 0,05$ ) e Torreões ( $p < 0,05$ ) apresentaram em média 13,39, 17,06 e 21,71 mL/dia, respectivamente, a mais de consumo de leite que aqueles que residiam na localidade de Filgueiras. Possivelmente isso ocorreu porque Filgueiras é considerado um bairro mais urbano. Coelho et al. (2009), em um estudo que objetivou investigar o padrão de consumo das famílias brasileiras, constatou que o leite fluido tem 5,19 pontos percentuais a mais de consumo no meio rural do que no meio urbano, principalmente devido à produção própria.

A idade foi negativamente associada ( $p < 0,001$ ) ao consumo de leite fluido, o aumento de uma unidade na idade foi acompanhada de uma redução de 0,25 mL no consumo de leite fluido *per capita* por dia, mas o sinal positivo para o coeficiente de seu termo quadrático ( $\text{Idade}^2$ ) mostra que o efeito global negativo é enfraquecido à medida que a idade aumenta. Crianças (2-9 anos) e idosos ( $> 70$  anos) apresentaram maior ( $p \leq 0,05$ ) média de consumo *per capita* de leite fluido (347,07 e 326,05 mL/dia, respectivamente) do que adolescentes (10-19 anos) e adultos (20-69 anos), 236,43 e 234,90 mL/dia, respectivamente. Estes resultados corroboram com os encontrados por Bai et al. (2008), que descreveram que idosos aumentam o consumo de leite porque tornaram-se mais conscientes de sua saúde e por serem suscetíveis a diversos problemas de saúde, alguns dos quais causados pela falta de cálcio.



**Figura 1.** Médias e desvio padrão da quantidade de leite fluido consumida *per capita* (mL/dia) para as cinco localidades estudadas.

Os resultados obtidos mostram que o consumo médio de leite fluido nas comunidades avaliadas esteve abaixo das recomendações de leite fluido (ou equivalente de derivados lácteos) da OMS, em todas as faixas etárias avaliadas, que é de 500 mL/dia para crianças abaixo de 9 anos, 750 mL/dia para crianças de 9 a 12 anos, 1 litro/dia para adolescentes e 500 mL/dia para adultos. No caso deste estudo, muitos adultos relataram que, apesar de gostarem de leite e o acharem importante para a saúde, não o consumiam, ou consumiam em pequena quantidade, por questões financeiras.

O coeficiente estimado para renda *per capita* também foi significativamente positivo ( $p < 0,001$ ). Para cada aumento de um salário mínimo na renda houve um aumento no consumo de leite fluido *per capita* de 8,88 mL/dia. Bai et al. (2008), em estudo sobre o consumo de leite fluido na China, encontraram que o consumo de leite aumenta com o aumento da renda até um determinado ponto e depois este aumento perde força, e isso ocorre devido a substituição do leite fluido por outros alimentos. No presente

estudo, como as comunidades estudadas tinham renda baixa e homogênea entre si, o mesmo não aconteceu.

O número de moradores por residência mostrou-se negativamente associado ( $p < 0,05$ ) à quantidade de leite fluido consumida diariamente *per capita*. Para cada morador a mais na residência, o consumo de leite reduziu em 0,37 mL/dia. Aparentemente, isso ocorreu devido à restrição da quantidade de leite fluido adquirida, por se tratar de uma população sabidamente de baixa renda.

O hábito de fumar também foi associado ao consumo de leite fluido diário ( $p < 0,05$ ). Para os indivíduos que fumavam menos de 10 cigarros por dia, essa redução não foi significativa. Entretanto, quando comparados os grupos dos indivíduos que não fumavam com os que fumavam 10 ou mais cigarros por dia, o coeficiente foi significativamente positivo, mostrando que os indivíduos que não fumavam consumiam, em média 21,71 mL/dia a mais de leite fluido do que os indivíduos que fumavam 10 ou mais cigarros por dia. Wilson (2002), estudando o tabagismo e a ingestão de leite, frutas, suco de frutas e legumes, também encontrou uma diminuição do consumo de leite associada com o histórico de tabagismo. Entretanto, as explicações para essa associação ainda não estão totalmente elucidadas.

**Tabela 1.** Análise multivariada para o consumo de leite fluido (mL/dia).

Variável	Coeficiente transformação $\sqrt{y}$	Estimativa original	Valor de p
<b>Local de residência (Filgueiras)</b>			
Humaitá	4,13	17,06	s**
Igrejinha	1,78	3,17	ns
Monte Verde	3,66	13,39	s*
Torreões	4,66	21,71	s**
<b>Idade</b>	-0,50	-0,25	s***
<b>Idade<sup>2</sup></b>	0,006	0,000036	s***
<b>Salário <i>per capita</i></b>	2,98	8,88	s***
<b>Número de moradores</b>	-0,61	-0,37	s**
<b>Tabagismo</b>			
Exagerado – 10 ou mais cigarros/dia	2,20	4,84	ns
Moderado – menos 10 cigarros/dia	4,66	21,71	s**
Ausente			

ns = não significativo; s = significativo; \* =  $p < 0,1$ ; \*\* =  $p < 0,05$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$  Não estão faltando dados na tabela, em relação ao tabagismo?

## Conclusões

Os resultados evidenciaram que a quantidade de leite consumida pela população de regiões limítrofes rural-urbanas de Juiz de Fora-MG está aquém das recomendações atuais de órgãos da saúde, em especial entre adolescentes e adultos, e que algumas variáveis, como local de residência, idade, renda, número de moradores no domicílio e hábito de fumar foram associadas a este consumo.

## Agradecimentos

À Fapemig, pela bolsa de iniciação científica.

## Literatura Citada

BAI, J.; WAHL, T. I.; MCCLUSKEY, J. J. Fluid milk consumption in urban Qingdao, China. *The Australian Journal of Agricultural and Resource Economics*, v. 52, p. 133-147, 2008.

COELHO, A. B.; AGUIAR, D. R. D.; FERNANDES, E. A. Padrão de consumo de alimentos no Brasil. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 47, n. 2, p. 335-362, 2009.

GOLDBARG, M. **Perfil do consumidor de leite do município de Volta Redonda – RJ**. Rio de Janeiro: 2007. Monografia de Especialização. Universidade Castelo Branco. 42 p., 2007.

MILLER, G. D.; JARVIS, J. K.; McBEAN, L. D. The importance of meeting calcium needs with foods. **Journal of the American College of Nutrition**. 20(2): 168s-185s, 2001.

MUEHLHOFF E.; BENNETT A.; MCMAHO D. **Milk and Dairy Products in Human Nutrition**. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO): Rome, Italy. 376 p. 2013.

OMS. ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Necessidades de energia e de proteínas**. Genebra, 1985. (Informe Técnico, 724).

WILSON, D. B. Patterns of fruit, vegetable and milk consumption among smoking and nonsmoking female tens. **American Journal of Preventive Medicine**. v. 22, n. 4, p. 240-246, 2002.

# **Análise da Diversidade Genética na Raça Holandesa no Brasil**

## **Analysis of Genetic Diversity in Brazilian Holstein Cattle**

Daiana de Souza Machado<sup>1</sup>, Claudio Nápolis Costa<sup>2</sup>, Glaucyana Gouvêa dos Santos<sup>2</sup>, João Cláudio do Carmo Panetto<sup>2</sup>, Pedro Ivo Lancellotta<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Bolsista IC/Fapemig – Graduanda em Ciências Biológicas CES/JF. Email: daianasm.dsm@gmail.com

<sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite. Email: claudio.napolis@embrapa.br

<sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite. E-mail: glaucyana.santos@embrapa.br

<sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite. E-mail: joao.panetto@embrapa.br

<sup>5</sup>Bolsista Embrapa – Graduando em Ciências da Computação/UFJF. E-mail: pedrooska@gmail.com

**Resumo:** O objetivo deste estudo foi analisar as informações de pedigree do gado Holandês no Brasil e quantificar o nível de endogamia e a diversidade genética na população. Foram analisadas as informações de registros de pedigree de 155.596 animais nascidos de 1960 a 2012 obtidos da base de dados genealógicos da ABCBRH. Foi definida como população referência as fêmeas nascidas entre 2006 e 2012 consistindo de 78.488 animais. O coeficiente médio de endogamia na população referência foi 0.004 e a porcentagem de animais consanguíneos foi 49% com coeficiente de endogamia igual a 0.008. Os intervalos entre gerações foram 6,8 e 5,9 anos nas populações geral e referência, respectivamente. Os 145 ancestrais mais influentes contribuíram com 50% da variabilidade genética da população referência. Apesar do aumento da porcentagem de animais consanguíneos, o nível de endogamia diminuiu nos últimos anos. O uso de semen importado e as decisões de acasalamento dos criadores têm contribuído para níveis aceitáveis de endogamia e diversidade genética do gado Holandês no Brasil.

**Palavras-chave:** Bovino leiteiro, consanguinidade, endogamia, registro de *pedigree*.

**Abstract:** The objective of this study was to analyze the pedigree information of the Brazilian Holstein cattle to quantify the inbreeding level and the genetic diversity in the population. Pedigree information including 155.596 registered animals born from 1960 to 2012 obtained from ABCBRH herd book database was analyzed. The current reference population (RP) was defined by the females born from 2006 to 2012 and comprised 78.488 animals. The average inbreeding in the reference population was 0,004 and the percentage of inbred animals was 49% with average inbreeding equal to 0,008. The average generation intervals were 6,8 and 5,9 years in the general and in reference populations, respectively. The 145 most influential ancestors accounted for 50% of inbreeding in the reference population. Despite the increase in percentage of inbred animals, the rate of inbreeding decreased in recent years. The use of imported germoplasm and mating decisions made by breeders have contributed to acceptable levels of inbreeding and genetic diversity in the Holstein cattle in Brazil.

**Key words:** Dairy cattle, inbreeding, pedigree analysis.

## **Introdução**

Os programas de seleção em gado de leite têm como finalidade o aumento do potencial genético dos animais devido a sua importância para a maior rentabilidade dos sistemas de produção. Os programas de seleção se baseiam em métodos e critérios de análise visando à identificação de animais superiores que serão os pais da geração seguinte. Estes programas tem sido eficazes na geração de progresso genético, mas também tem causado aumento das taxas de endogamia nas principais raças bovinas leiteiras.

O efeito da endogamia (consanguinidade) no desempenho animal, devido aos genes em dominância e, na variabilidade entre e dentro de linhagens, devido ao efeito aditivo dos genes, é geralmente estimado como função linear dos coeficientes de endogamia. Este efeito,

denominado depressão por endogamia, caracteriza-se pela redução no desempenho dos animais consanguíneos, em produção e fertilidade das vacas, aumento de natimortos, inibição da resistência às doenças e diminuição da longevidade.

A raça Holandesa é a mais difundida entre as raças européias de aptidão leiteira criada no Brasil. O seu desenvolvimento no País tem se baseado em importação de animais vivos (novilhas e vacas) da Argentina e do Uruguai e, principalmente, embriões e sêmen principalmente de países da América do Norte e da Europa (COSTA et al., 2001). Estima-se que mais de 90% do semen utilizado no Brasil é de touros importados. Neste contexto é importante disponibilizar informações orientadoras para decisões sobre estratégias de acasalamento que evitem a consanguinidade intencional e minimizem os seus efeitos negativos no desempenho dos rebanhos. Em adição, a taxa de progresso genético dos programas de seleção depende da variabilidade genética existente na população.

Um método prático e comumente usado para quantificar a taxa de endogamia e avaliar a diversidade genética é realizar uma análise da estrutura da população por meio de informações dos registros de genealogia (pedigree) dos animais. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade genética de bovinos da raça Holandesa no Brasil, por meio de análises de *pedigree* dos animais registrados.

## **Material e Métodos**

### **Base de Dados**

Foram utilizadas as informações de pedigree de animais registrados na base de dados do Serviço de Registro Genealógico da Associação Brasileira de Criadores de Bovinos da Raça Holandesa - ABCBRH, disponibilizada para as avaliações genéticas da raça pela Embrapa Gado de Leite. A base de dados atualmente compreendeu aproximadamente dois milhões de registros de animais nascidos entre 1911 e 2012. Os registros foram editados para a inclusão de somente animais com ano de nascimento conhecido. Definiu-se 1960 como o ano base de início dos registros, considerando um número mínimo de animais registrados, em quantidade consistente e crescente com os anos seguintes. Foi também restruturada a identificação dos touros, cujo sêmen importado é intensamente usado por meio da inseminação artificial. Para ajustamento da base de dados aos requisitos dos programas computacionais, foi necessário atribuir o ano de nascimento de 1955 a alguns ascendentes de animais que não tinham data de nascimento conhecida. Estes animais, que se incluem entre os animais fundadores (com pais desconhecidos), são assumidos sem relacionamento de parentesco e com coeficiente de endogamia igual a zero. A edição inicial resultou na disponibilidade de 655.198 registros de pedigree. Posteriormente definiu-se como população de referência (PR) as fêmeas nascidas entre 2006 e 2012, que representam a atual geração de animais em produção e candidatos à seleção. Foram então extraídos os ascendentes da PR utilizando-se os programas abaixo referenciados, resultando em 155.596 registros na base de dados analisada, denominada neste estudo de população geral.

### **Análise do pedigree**

Os programas ENDOG (GUTIÉRREZ AND GOYACHE, 2005), Eva (BERG et al., 2006) e CFC (SARGOLZAEI et al., 2006) foram utilizados para estimativa de parâmetros que caracterizam a diversidade genética. O manual dos programas acima apresentam o método de cálculo de cada um dos parâmetros: taxas de endogamia de animais, da população, parentesco médio, número efetivo de fundadores e de ancestrais, intervalo de gerações e contribuição genética marginal e acumulada dos ancestrais, abaixo descritos.

### **Coeficiente de endogamia ( $F$ )**

Mede a porcentagem de pares de genes que são idênticos por descendência, ou seja, que foram recebidos de um mesmo ascendente comum aos pais do animal.

### **Parentesco médio ( $AR$ )**

É a probabilidade de um alelo, escolhido ao acaso na população, pertencer a um indivíduo ou a um grupo de indivíduos de uma população. É uma medida da taxa de endogamia, sob acasalamento ao acaso entre os indivíduos da população. Assim, a diferença entre os coeficientes  $F$  e  $AR$  informa a estrutura de acasalamento não ao acaso na população.

**Número efetivo de fundadores ( $f_e$ )**

É o número de fundadores que seriam esperados em contribuir igualmente para produzir a mesma diversidade genética observada na população de referência. O número efetivo de fundadores é geralmente menor do que o número real de fundadores (animais com ambos os pais desconhecidos) por causa de contribuições desiguais dos fundadores para a atual população devido à seleção e diferenças nos tamanhos das famílias.

**Número efetivo de ancestrais ( $f_a$ )**

É o número mínimo de ancestrais (incluindo fundadores e não fundadores) necessário para explicar a diversidade genética observada na população de referência.

**Intervalo de gerações ( $L$ )**

É a média da idade dos pais quando nascem suas progenies.

**Contribuição genética**

Quantifica a participação dos ancestrais (não apenas os fundadores) identificados como de maior contribuição genética para a população de referência.

## Resultados e Discussão

As estimativas dos parâmetros estudados nas populações geral e referência são apresentados na Tabela 1. As médias de consanguinidade das populações geral e referência foram 0,005 e 0,004, respectivamente. Nesta ordem, os percentuais de animais consanguíneos foram 41,0 % e 49,0%, com médias dos coeficientes de endogamia iguais a 0,012 e 0,008 (Tabela 1).

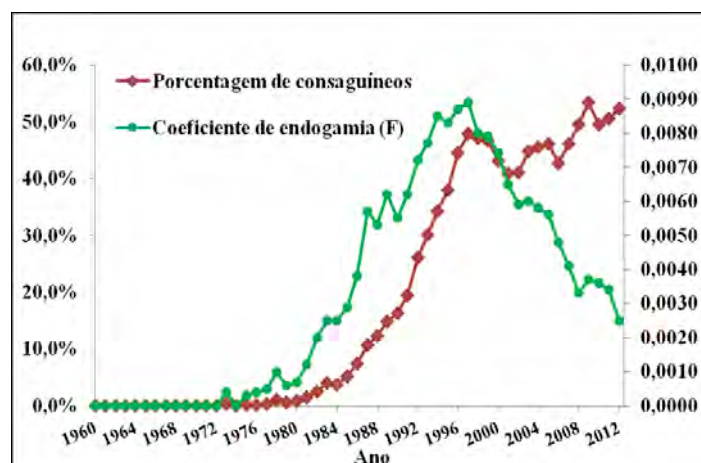
**Tabela 1.** Parâmetros descritivos da estrutura e diversidade genética da raça Holandesa no Brasil.

Parâmetros/População	Geral	Referência
Tamanho da população	155.596	78.488
Número de animais consanguíneos	63.746	38.475
Porcentagem de animais consanguíneos	41,0%	49,0%
Média do coeficiente de endogamia ( $F$ )	0,005	0,004
Média do coeficiente de endogamia nos animais consanguíneos	0,012	0,008
Coeficiente de endogamia máximo ( $F$ , %)	39,80	31,25
Coeficiente médio de parentesco ( $AR$ )	0,009	0,010
Intervalo entre gerações (anos)	6,8	5,9
Número de fundadores	6.241	635
Número efetivo de fundadores ( $f_e$ )	161	257
Número efetivo de ancestrais ( $f_a$ )	119	151
Número de ancestrais explicando 50% da contribuição genética	93	145

Paiva (2006) relatou o valor de  $F$  igual a 0,0038 para animais da raça Holandesa nascidos entre 1960 e 2002, praticamente igual ao valor observado na população referência. Este autor obteve o valor 0,023 para os animais endogâmicos, superior aos observados nas populações desse estudo. A Figura 1 ilustra a evolução dos níveis de animais consanguíneos e de endogamia por ano de nascimento, no período de 1960 a 2012. As tendências observadas indicam uma redução no nível de endogamia, após ter alcançado valor máximo de 0,0089 em 1997, mesmo com um crescimento contínuo, em anos recentes, da porcentagem de animais consanguíneos na população.

Os valores observados para a razão  $f_e/f_a$  (Tabela 1) foram iguais a 1,35 na população geral e 1,70 na população referência, indicando o uso de maior número de reprodutores nos últimos anos, representados na população referência. Esta tendência é comprovada pelo aumento do número de ancestrais com contribuição acumulada de 50% que evoluiu de 93 para 145 na população geral para a população referência. Esta tendência sugere uma melhoria nas estratégias de acasalamento adotadas pelos criadores, conforme observado por Stachowicz et al. (2011), com a raça Holandesa no Canadá. Entretanto, os valores médios de  $F$  foram inferiores aos de  $AR$  sugerindo a ocorrência de acasalamentos não ao acaso na população, tendência também observada por Stachowicz et al. (2011).

O intervalo médio entre gerações foi de 5,9 anos na população referência, inferior a 6,8 anos na população geral. Este valor é inferior a 7,3 anos observado por Paiva (2006) para a raça Holandesa, entre 1960 e 2002. Embora tendo reduzido nos últimos anos, o IG médio é superior a 5,45 anos reportados por Stachowicz et al. (2011), o que compromete a realização de maior progresso genético por geração em programas de seleção.



**Figura 1.** Evolução dos níveis de animais consanguíneos e da endogamia, por ano de nascimento, na raça Holandesa no Brasil

## Conclusões

O aumento do número de animais consanguíneos não resultou no aumento do nível de endogamia no período considerado neste estudo, muito provavelmente devido às estratégias de acasalamento adotadas pelos criadores, mesmo praticando acasalamentos não acaso. Neste particular, o uso intensivo de semen de animais importados também pode ter contribuído para o baixo nível de consanguinidade na raça Holandesa no Brasil.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura citada

BERG, P.; NIELSEN, J.; SORENSEN, M. K. EVA: **Realized and predicted optimal genetic contributions**. In: Proceedings of the 8th World Cong. Genet. Appl. to Livest. Prod., Belo Horizonte, Brazil. 2006. CDRom, comm. n.27-09.

COSTA, C.N.; CASTRO, R.P.; HAGUIHARA, K.; MARQUES, A. **Genetic progress in Holstein cattle in Brazil**. ANAIS DO VI CONGRESSO HOLSTEIN DE LAS AMERICAS. p. 105-120, 2001.

GUTIÉRREZ, J. P.; GOYACHE, F. A note on ENDOG: a computer program for analysing pedigree information. **J. Anim. Breed. Genet.**, 122: 172-176, 2005.

PAIVA, A. L. C. **Endogamia na raça Holandesa no Brasil**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal de Viçosa. 2006. 38p.

SARGOLZAEI, M., IWAISAKI, H., COLLEAU, J. J. **CFC: a tool for monitoring genetic diversity**. 2006. In: Proceedings of the 8<sup>th</sup> World Cong. Genet. Appl. to Livest. Prod., Belo Horizonte, Brazil. 2006. CDRom, comm. No. 27-28

STACHOWICZ, K.; SARGOLZAEI, M.; MIGLIOR, F.; SCHENKEL, F. S. Rates of inbreeding and genetic diversity in Canadian Holstein and Jersey cattle. **J. Dairy Sci.**, 94:5160–5175, 2011.



# **Variação na contagem de células somáticas e na produção de leite de rebanhos bovinos da raça holandesa de acordo com o isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite do tanque de expansão<sup>1</sup>**

Núbia Karolina Pifano<sup>1</sup>, Guilherme Nunes de Souza<sup>2</sup>, Marcio Roberto Silva<sup>2</sup>, Maria Aparecida Vasconcellos Paiva Brito<sup>2</sup>, Carla Cristine Lange<sup>2</sup>, Letícia Scafutto de Faria<sup>3</sup>, Samuel Miguel Hylario<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Bolsista de Iniciação Científica Fapemig/Embrapa Gado de Leite

<sup>2</sup> Pesquisador da Embrapa Gado de Leite

<sup>3</sup> Estagiária Embrapa Gado de Leite

<sup>4</sup> Estudante de Medicina Veterinária/Unipac

**Resumo:** Este trabalho teve como objetivos avaliar a associação entre a presença de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em rebanhos leiteiros com a contagem de células somáticas (CCS) e a média de produção de leite em 305 dias de lactação. Foram coletadas amostras de leite do tanque de expansão de 32 rebanhos para realização do isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* e CCS. Para avaliar a associação entre a presença dos patógenos com a CCS foi usado o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fischer. A comparação das médias de produção de leite de acordo com o isolamento foi realizada por meio da análise de variância e diferença dos quadrados mínimos. Foi observada associação ( $p < 0,05$ ) entre a presença de *S. aureus* mais *S. agalactiae* com a CCS de rebanho superior a 400.000 células/mL. Nos rebanhos sem isolamento de ambos patógenos, com isolamento somente de *S. aureus* e com isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* as produções médias foram de 9.604, 8.409 e 7.384 litros, respectivamente. Foi observada diferença ( $p < 0,05$ ) entre as produções médias nos rebanhos com isolamento de ambos patógenos em relação aos demais. O isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* foi associado a CCS superior a 400.000 células/mL e redução na produção média de leite. Sugere-se que a presença de *S. agalactiae* foi responsável pela dificuldade em atender aos padrões estabelecidos pela legislação e pela redução na produção de leite nos rebanhos estudados.

**Palavras-chave:** mastite bovina, mastite contagiosa, mastite subclínica, produção de leite

**Abstract:** This study aimed to evaluate the association between the presence of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* with somatic cell count (SCC) and the average milk production in 305 days of lactation. Milk samples were collected from expansion tank of 32 flocks for achievement of the isolation of *S. aureus* and *S. agalactiae* and CCS. To evaluate the association between the presence of pathogens with the CCS was used the chi-square test and the Fisher exact test. The comparison of the average milk production according to the isolation was performed by means of analysis of variance and difference of least squares. Association was observed ( $p < 0.05$ ) between the presence of *S. aureus* more *S. agalactiae* with the CCS of flock more than 400,000 cells/mL, however, the same was not observed for the presence of *S. aureus*. In herds without insulation of both pathogens, with insulation only *S. aureus* and with isolation of *S. aureus* and *S. agalactiae* productions medium were 9,604, 8,409 and 7,384 liters, respectively. Difference was observed ( $p < 0.05$ ) between the average production in flocks with insulation of both pathogens in relation to others. The isolation of *S. aureus* and *S. agalactiae* was associated with the CCS more than 400,000 cells/mL and reduction in average milk production. It is suggested that the presence of *S. agalactiae* was responsible for difficulty in meet the standards established by the law and by the reduction in milk production in herds studied.

**Keywords:** bovine mastitis, contagious mastitis, subclinical mastitis, yield production

## Introdução

A produção leiteira é um importante setor do agronegócio brasileiro e vem passando por um período de evolução. Um exemplo desta evolução foi a inclusão de limites para a contagem de células somáticas na legislação federal por meio da publicação da Instrução Normativa nº 51 (IN51) e Instrução Normativa nº 62 (IN62). O limite máximo de 400.000 células/mL foi estabelecido para todo o Brasil a partir de 2017.

O principal fator que influencia a CCS de vacas em lactação e consequentemente a CCS do rebanho é a infecção da glândula mamária, denominada mastite. Patógenos da mastite, especificamente *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, são responsáveis por grandes alterações na composição do leite e variação na CCS (HARMON, 1994). O isolamento e importância desses patógenos em rebanhos bovinos leiteiros, bem como a variação da CCS em função destes patógenos têm sido relatados por diversos autores (HARMON, 1994; DJABRI et al., 2002; SOUZA et al., 2009).

A mastite é uma doença endêmica em rebanhos leiteiros de todo o mundo e causa as maiores perdas econômicas relacionadas às doenças da produção (HALASA et al., 2007). O objetivo do presente estudo foi avaliar a associação da CCS e da produção média em 305 dias de lactação de rebanhos da raça holandesa de acordo com o isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae* em amostras de leite do tanque de expansão.

## Material e Métodos

Amostras de leite de 32 rebanhos (tanque de expansão) foram coletadas para isolamento de *S. aureus* e *S. agalactiae*, e para a realização da contagem de células somáticas. As amostras para os exames microbiológicos foram coletadas em frascos estéreis e para CCS foram coletadas em frascos com Bronopol®. As amostras foram armazenadas sob temperatura de refrigeração até o momento de realização dos exames para CCS. As amostras para exames microbiológicos foram congeladas para serem testadas em bateria. Os exames bacteriológicos foram realizados de acordo com Brito et al. (1998) no Laboratório de Microbiologia do Leite da Embrapa Gado de Leite. A CCS foi realizada em equipamentos automatizados pelo método de citometria de fluxo. Os dados de produção média do rebanho em 305 dias de lactação foram obtidos por meio do Relatório 4 da Associação dos Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais (ACGHMG). Os resultados de CCS foram classificados como superior e inferior a 400.000 células/mL. A associação entre o isolamento dos patógenos e a CCS foi avaliada pelo teste do qui-quadrado e o teste exato de Fischer. Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar a normalidade da variável produção média dos rebanhos em 305 dias de lactação. A comparação das médias dos rebanhos em 305 dias de lactação de acordo com o isolamento dos patógenos da mastite foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) e diferença dos quadrados mínimos.

## Resultados e Discussão

Foi observado isolamento de *S. aureus* e *S. aureus* mais *S. agalactiae* em 12 (37,6) e 10 (31,2%) rebanhos, respectivamente. Em 10 (31,2%) rebanhos não foi observado isolamento de ambos patógenos. Foi observada uma associação significativa estatisticamente ( $p < 0,05$ ) entre os rebanhos com isolamento de *S. aureus* mais *S. agalactiae* com a CCS superior a 400.000 células/mL em relação aos rebanhos que não houve isolamento. Os rebanhos com isolamento de ambos patógenos apresentou 9,3 mais chances de apresentarem a CCS superior a 400.000 células/mL em relação aos rebanhos que não apresentaram isolamento de ambos patógenos (Tabela 1). Entretanto, não foi observada associação estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ) entre rebanhos com isolamento somente de *S. aureus* com a CCS superior a 400.000 células/mL. Para os rebanhos que não houve isolamento, para os com isolamento somente de *S. aureus* e com isolamento de *S. aureus* mais *S. agalactiae*, a produção média em 305 dias de lactação destes rebanhos foi 9.604, 8.409 e 7.384 litros, respectivamente. Foi observada uma

diferença estatisticamente diferente ( $p < 0,05$ ) entre a produção média em 305 dias de lactação entre os rebanhos com isolamento de ambos patógenos em relação aos rebanhos com isolamento somente de *S. aureus* e aos rebanhos que não apresentaram isolamento de ambos patógenos em 305 dias de lactação. Não foi verificada diferença estatística ( $P > 0,05$ ) entre os rebanhos com isolamento de *S. aureus* em relação aos rebanhos que não apresentaram algum isolamento. A presença de *S. aureus* e *S. agalactiae* está geralmente associada a casos de mastite subclínica crônica, causando elevada CCS em animais e consequentemente nos rebanhos por longos períodos. Entretanto, a presença de *S. agalactiae* nos rebanhos está associada a altas CCS, resíduo de antimicrobianos no leite e redução na produção de leite (KEEFE, 1997). Os resultados sugerem que o maior impacto no aumento da CCS e na redução da produção média em 305 dias de lactação foi devido à presença de *S. agalactiae* nos rebanhos. É importante destacar que para *S. aureus* o foco é no controle e prevenção por meio do descarte de vacas cronicamente infectadas e para o *S. agalactiae* o foco é no controle, prevenção e erradicação por meio do tratamento dos animais infectados. Os resultados podem ser usados para sensibilizar os produtores em relação ao aumento da CCS e redução da produção de leite a adotar medidas de controle, prevenção e erradicação quando possível destes patógenos da mastite.

**Tabela 1.** Distribuição de frequência de rebanhos da Associação dos Criadores de Gado Holandês de Minas Gerais da contagem de células somáticas e produção média em 305 dias de lactação de acordo com o isolamento de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* em amostras de leite do rebanho (tanque de expansão) no período de 2011/2012.

Isolamento	F	CCS (x1.000)		p	RR	IC 95%	Produção média em 305 dias de lactação (litros)
		<400	>400				
Sem isolamento	n	7	3	0,41	-	-	9.064 <sup>a</sup>
	%	50,0	27,3				
<i>S. aureus</i>	n	7	8	0,04	9,3	1,2 – 73,0	8.409 <sup>a</sup>
	%	50,0	72,7				
Sem isolamento	n	7	3	0,04	9,3	1,2 – 73,0	9.064 <sup>a</sup>
	%	77,8	27,3				
<i>S. aureus</i> + <i>S. agalactiae</i>	n	2	8	0,04	9,3	1,2 – 73,0	7.384 <sup>b</sup>
	%	22,2	72,7				

F – frequência; n – número de rebanhos; % - percentual de rebanhos; P – nível de significância exato para distribuição unicaudal; RR – risco relativo; IC - intervalo de confiança; <sup>a</sup> letras diferentes entre linhas significa diferença estatística ( $p < 0,05$ ).

**Fonte:** Embrapa Gado de Leite (Fapemig – APQ 01305/2010), 2013.

## Conclusões

Considerando que todos os rebanhos possuem o mesmo padrão racial (Holandês), os resultados sugerem que a principal causa de aumento da CCS e redução na produção de leite foi a presença de *S. agalactiae*. Sendo assim, sugere-se que a presença deste patógeno nos rebanhos causará maiores dificuldades em atender o limite estabelecido na IN 62 de 400.000 células/mL.

## Agradecimentos

Fapemig pelo apoio financeiro para condução do trabalho (APQ 01305/2010).

## Literatura Citada

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J.R.F; SOUZA, H. M. et al. Avaliação da sensibilidade da cultura de leite do tanque para isolamento de agentes contagiosos da mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 18, p. 39-44, 1998.

DJABRI, B., BAREILLE, N., BEAUDEAU, F., SEEGER, H. Quarter milk somatic cell count in infected cows: a meta-analysis. **Veterinary Research**, v.33, p.335-357, 2002.

HALASA, T.; HUIJPS, K.; OSTERAS, O.; HOGVEEN, H. Economic effects of bovine mastitis management: a review. **Veterinary Quarterly**, v.29, n.1, p.18-31, 2007.

HARMON, R. J. Physiology of mastitis and factors affecting somatic cell counts. **Journal Dairy Science**, v. 77, p. 2103-2113, 1994.

KEEFE, G. P. *Streptococcus agalactiae* mastitis: a review. **Canadian Veterinary Journal**, v. 38, n. 7, p. 429-435, 1997.

SOUZA, G.N., BRITO, J.R.F., MOREIRA, E.C., BRITO, M.A.V.P., SILVA, M.V.G.B. Variação da contagem de células somáticas em vacas leiteiras de acordo com patógenos da mastite. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.5, p.1015-1020, 2009.

# **Banco de DNA da Embrapa Gado de Leite e Genotipagem dos Touros do Teste de Progenie da Raça Girolando**

## **DNA Bank of Embrapa Gado de Leite and Genotyping of Progeny Test bulls of Breed Girolando**

Sula Abdallah Vieira Martins<sup>1</sup>, Isabela Fonseca<sup>2</sup>, Gisele Nogueira Fogaza<sup>3</sup>, Felipe de Oliveira Vieira<sup>3</sup>, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>4</sup>, Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>5</sup>, Isabela Gomes Barreto da Motta<sup>6</sup>, Wagner Antônio Arbex<sup>7</sup>, Katia Cristina Lage dos Santos<sup>7</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>8</sup>, Marcos Vinicius Barbosa da Silva<sup>8</sup>

<sup>1</sup>Graduanda de Ciências Biológicas, Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG. e-mail: sula@cabanguinternet.com.br

<sup>2</sup>Doutoranda, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa/MG

<sup>3</sup>Graduando de Ciências Biológicas, Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG

<sup>4</sup>Pós-doutoranda, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG

<sup>5</sup>Doutoranda, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG

<sup>6</sup>Bolsista de Apoio Técnico, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

<sup>7</sup>Analista, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

<sup>8</sup>Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

**Resumo:** O Banco de DNA de Bovinos de Leite da Embrapa Gado de Leite contém amostras de várias raças e, além de DNA dos touros participantes dos testes de progênie conduzidos pela Unidade. As associações de criadores e parceiros da Embrapa Gado de Leite coletam material biológico, geralmente sangue e sêmen, e enviam para o Laboratório de Genética Molecular (LGM) para extração de DNA por meio de protocolos *in house*, kits manuais ou extração automatizada. As amostras são quantificadas e armazenadas em ultrafreezer a -80 °C. A genotipagem para os genes candidatos incluídos no sumário de touros da raça Girolando é feita no próprio LGM, mas amostras do Banco de DNA também são encaminhadas para empresas contratadas para a genotipagem em microarranjos de DNA. Este trabalho, portanto, tem o objetivo de mostrar como é gerado e gerenciado o Banco de DNA e como as amostras contidas nele podem ser utilizadas em diferentes projetos.

**Palavras-chave:** Extração de DNA, material biológico, genes.

**Abstract:** The DNA Bank of Dairy Cattle of the Embrapa Gado de Leite contains samples of many different breeds of cattle, besides DNA from bulls participating in the progeny test headed by Embrapa. Breeders' associations and partners of Embrapa Gado de Leite collect biological tissue, usually blood and semen, and send to the Molecular Genetics Lab (LGM) for DNA extraction using in-house protocols, manual or automated extraction kits. The samples are quantified and stored at -80 °C. The genotyping for candidate genes included in the Girolando Sire Summary is made in the LGM itself, but the DNA samples are also sent to service providers for genotyping in SNP chips. This study aims to show how it is generated and managed the Bank of DNA and how the samples contained therein can be used in different projects.

**Keywords:** DNA extraction, biological material, genes.

### **Introdução**

O Banco de DNA de Bovinos Leiteiros da Embrapa Gado de Leite envolve o trabalho de várias pessoas responsáveis pela obtenção de material genético, extração de DNA e posterior genotipagem de cada animal inscrito no teste de progênie (TP). O TP tem como objetivo principal estimar o valor genético de reprodutores com base no

desempenho de suas filhas. Este banco é de suma importância para a conservação do material genético para estudos de genes relacionados a doenças, produção, longevidade e que auxiliem na seleção de animais para o melhoramento do rebanho.

Para obtenção desses resultados é necessário genotipar os animais para diversos marcadores moleculares, a partir do seu DNA extraído no Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa Gado de Leite. Os touros inscritos no TP da raça Girolando são genotipados no próprio LGM para alguns genes candidatos por meio de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) e géis de agarose. Os genes analisados são: OPN (osteopontina), DGAT1 (diacilglicerol O-aciltransferase 1), LGB (lactoglobulina), BLAD (Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina), DUMPS (Deficiência de Uridina Monofosfato Sintase) e CVM (Complexo de Má Formação Vertebral). Para a genotipagem de microarranjos de DNA, as amostras são encaminhadas para empresas contratadas.

Os dados fenotípicos dos animais inscritos no TP são coletados por técnicos de associação de criadores e depois são realizados estudos de associação entre esses fenótipos e os dados dos animais genotipados por meio de *chips*. Com esses estudos de associação é possível identificar possíveis locos responsáveis por características de interesse na pecuária leiteira.

O Banco de DNA de Bovinos Leiteiros tem como objetivo armazenar informações padronizadas sobre os animais, além de viabilizar o desenvolvimento de pesquisas em genômica aplicada ao melhoramento animal. Frente a isto, o presente trabalho tem como objetivo descrever como é o funcionamento do Banco e como suas informações são utilizadas.

## Material e Métodos

O material biológico para a extração de DNA é coletado pelas Associações de Criadores. O sangue chega ao Laboratório de Genética Molecular (LGM) em tubos *vacutainer* com EDTA e o sêmen em paletas, todos com identificação do animal. Essas amostras são armazenadas na geladeira (sangue) e em N<sub>2</sub> líquido (sêmen) até a extração. As extrações de DNA são feitas utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com as recomendações do fabricante.

Para extração de DNA a partir de sangue, este é lavado com PBS 1X (KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2 mM, NaCl 137 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 10,1 mM) e tratado com Proteinase K, para degradação das proteínas. Em seguida é adicionado um tampão de lise incluído no kit e as amostras incubadas a 56 °C por 1 hora. Após retirar as amostras do banho maria, é adicionado etanol absoluto e em seguida são realizadas duas etapas de lavagem com tampões próprios do kit. Este método utiliza colunas com membranas de sílica pelas quais o DNA tem afinidade, ficando ali aderido até que se coloque o tampão de eluição (MOTTA, 2012). A extração de DNA a partir de sêmen segue o mesmo protocolo de sangue, porém, antes de iniciar o protocolo de extração, ele é lavado com tampão X2 (Tris HCl pH 8,0 1 M, EDTA 0,5 M, NaCl 5 M, SDS 10%, DTT 1 M) para a retirada do eluente. Atualmente, parte das extrações está sendo feitas automaticamente no QIAAsymphony (Qiagen). Essa máquina permite fazer um maior número de extrações em menos tempo, com melhor qualidade e menor erro.

Após o procedimento de extração, o DNA é quantificado no Nanodrop® 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA Nanodrop®), que é um espectrofotômetro que avalia a concentração de DNA (ng/ul) e a qualidade da amostra com base nos parâmetros de absorbância a 260 nm, 280 nm e 230 nm, cuja razão 260/280 deve ter um valor entre 1,8 e 2,0 (MOTTA, 2012). Depois as amostras são organizadas em caixas para microtubos devidamente identificadas e próprias para serem armazenadas no ultrafreezer a -80 °C. As informações dos animais com DNA extraído são colocadas em uma planilha de Excel, com o nome do animal, o código do laboratório, data da extração, os dados do espectrofotômetro (Figura 1) e o mapa de cada caixa (Figura 2).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1	N	Caixa	Código do Lab	RGD	Nome	Sexo	Data da extração	Concentração (ng/ul)	Razão (260/280)	Razão (260/230)	Quantidade (ug)
2	1	IB 1.1	GLTIB1		Bacara 111B0003	M	7-dez-12	127.32	1,53	0,55	23
3	2	IB 1.2	GLTIB2		Nitrato 50470	M	8-jan-13	94.24	1,33	0,35	16
4	3	IB 1.3	GLTIB3		Ike	M	11-jun-13	70.95	1,87	1,90	102
5	4	IB 1.4	GLTIB4		32-LA-Botucca	M	6-jun-13	62.43	1,81	1,91	90
6	5	IB 1.5	GLTIB5		183-Caio	M	10-jun-13	82.82	1,82	2,16	104
7	6	IB 1.6	GLTIB6		02-Don Juann	M	27-mai-13	43.55	1,85	1,87	18
8	7	IB 1.7	GLTIB7		01-Klassikko	M	27-mai-13	77.39	1,85	2,26	97
9	8	IB 1.8	GLVIB1		86-Arenna	F	11-jun-13	55.75	1,98	1,55	87
10	9	IB 1.9	GLVIB2		6201-Espanholla	F	5-jun-13	70.85	1,90	1,95	50
11	10	IB 1.10	GLVIB3		69-Deputadda	F	11-jun-13	57.93	1,86	1,86	83
12	11	IB 1.11	GLVIB4		89-Doutrinna	F	6-jun-13	63.9	1,82	2,05	92
13	12	IB 1.12	GLVIB5		59-Fotografia*	F	3-jun-13	83.37	1,88	2,04	121
14	13	IB 1.13	GLVIB6		84-Cinderella	F	4-jun-13	55.43	1,83	2,15	85
15	14	IB 1.14	GLVIB7		72-Debutante	F	3-jun-13	74.2	1,85	2,06	92
16	15	IB 1.15	GLVIB8		76-Hamarulla*	F	3-jun-13	127.12	1,87	1,94	161
17	16	IB 1.16	GLVIB9		74-Hadijja	F	3-jun-13	83.62	1,87	1,84	121
18	17	IB 1.17	GLVIB10		38-Morena	F	11-jun-13	104.95	1,85	2,03	155
19	18	IB 1.18	GLVIB11		36-Kangga	F	29-mai-13	63.89	1,86	1,82	94
20	19	IB 1.19	GLVIB12		37-Konkistta	F	11-jun-13	127.41	1,89	2,12	189
21	20	IB 1.20	GLVIB13		87-Habsolutta	F	3-jun-13	69.37	1,83	1,67	44
22	21	IB 1.21	GLVIB14		98-Neblinna	F	4-jun-13	120.99	1,87	2,01	155
23	22	IB 1.22	GLVIB15		32-Madonna	F	4-jun-13	75.81	1,87	2,08	56
24	23	IB 1.23	GLVIB16		20-Espátulla	F	28-mai-13	83.07	1,81	2,16	123
25	24	IB 1.24	GLVIB17		19-Bailarina	F	28-mai-13	69.83	1,84	2,02	103

Figura 1. Configuração do atual Banco de DNA.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O
1	Sigla	Raça	Mapa das caixas												
2	AG	Angus													
3	BH	Brahman													
4	CR	Caracu													
5	FQ	Franqueiro													
6	GH	Girolando													
7	GU	Guzerá													
8	HF	Hereford													
9	HO	Holandês													
10	IB	Indubrasil													
11	NE	Nelore													
12	NM	Nelore Mocho													
13	SI	Sindi													
14	TP	Tabapuã													
15															
16	Exemplos de códigos para animais:														
17	GLTBH1	Gado de Leite - Touro - Brahman - 1													
18	GLTTP27	Gado de Leite - Touro - Tabapuã - 27													
19	GLVCR12	Gado de Leite - Vaca - Caracu - 12													
20	GLVGH56	Gado de Leite - Vaca - Girolando - 56													
21						Exemplos de códigos para posições nas caixas:									
22						GU 1.9	Guzerá - Caixa 1 - posição 9								
23						HO 2.36	Holandês - Caixa 2 - posição 36								
24						NM 3.60	Nelore Mocho - Caixa 3 - posição 60								
25															

Figura 2. Esquema do mapa das caixas armazenadas no ultrafreezer a -80 °C.

## Resultados e Discussão

Atualmente o Banco de DNA de Bovinos Leiteiros possui amostras das raças Gir Leiteiro, Guzerá, Sindi, Girolando, Jersey e Holandês, Angus, Brahman, Caracu, Franqueiro, Hereford, Indubrasil, Nelore, Nelore Mocho e Tabapuã. Para a raça Girolando foram genotipados no LGM um total de 1.287 animais para os seguintes genes candidatos: OPN, DGAT1, LGB, BLAD, DUMPS e CVM.

Em 2013, 911 animais foram encaminhados para empresas de genotipagem, que são empresas especializadas em biotecnologia agrícola para genotipagem em *chips* de alta densidade, podendo ser genotipado uma grande quantidade de genes em um único *chip*.

Frente à necessidade de se ter acesso a esses dados de maneira rápida e confiável, está sendo formulado uma solução computacional com acesso web para armazenar e recuperar esses dados. Para ter acesso a esse novo Banco de Dados será necessário fazer um cadastro com: identificador, CPF, nome e função (SANTOS, 2013).

## Conclusões

Pode-se observar que o Banco de DNA de Bovinos Leiteiros da Embrapa Gado de Leite vem aumentando gradativamente o número de amostras disponíveis para genotipar dos touros inscritos nos testes de progênie, fornecer material para atividades previstas em projetos de seleção genômica e para futuros estudos de melhoramento.

## Agradecimentos

Fapemig

## Literatura Citada

MOTTA, Isabela Gomes Barreto. **Avaliação fenotípica e alélica das doenças BLAD, CVM e DUMPS em animais da raça Girolando**. f. 42. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas, habilitação Licenciatura plena). Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

SANTOS, K.C.L.; ARBEX, W.A.; SILVA, M.V.G.B.; MARTINS, M.F.; FONSECA, I.; SANTOS, D.J.A. **Sistema de armazenamento para a organização e o controle do banco de DNA de bovinos de leite**. In: XII Congresso Internacional do Leite, 2013, Porto Velho/RO.

SILVA, Marcos Vinicius G. Barbosa da, et al. **Programa de Melhoramento genético da Raça Girolando – Avaliação genética de Vacas** – Julho/2013. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2013. 44p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 165).



# **Avaliação da porcentagem de proteína bruta em progênes de *Cynodon nlemfuensis***

## **Evaluation of protein percentage in progenies of *Cynodon nlemfuensis***

Bruna de Paula Dias<sup>1</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Larissa Figueiredo Aguiar Serra<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estudante do curso de Ciências Biológicas no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES.

<sup>2</sup> Pesquisador Melhoramento de Forrageiras da Embrapa Gado de Leite.

**Resumo:** Foram avaliadas 182 progênes de *Cynodon nlemfuensis* quanto a variabilidade da porcentagem de proteína bruta (% PB). O experimento foi avaliado em blocos aumentados com cinco testemunhas comuns em cada um dos 4 blocos. Foram coletadas amostras de forragem de cada parcela para obter a massa seca, necessária para estimar a % PB utilizando aparelho NIR. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Genes. Os resultados mostraram que as progênes de *Cynodon nlemfuensis* apresentam variabilidade genética para % PB e que algumas progênes superaram as testemunhas em relação a característica avaliada.

**Palavras-chave:** grama estrela roxa, melhoramento forrageiro, qualidade nutricional.

**Abstract:** Were evaluated 182 progenies of *Cynodon nlemfuensis* as the variability of protein percentage (% P). The experiment was evaluated in augmented block design with five common witness in each of the 4 blocks. Forage samples from each plot were collected for dry matter, necessary to estimate the % P apparatus using NIR's. Statistical analyzes were performed using the Genes software. The results showed that the progenies of *Cynodon nlemfuensis* show genetic variability for % P and some progenies exceeded witnesses regarding trait.

**Keywords:** forage breeding, nutritional quality, purple star grass.

## **Introdução**

Dentre as gramíneas existentes como alternativas para exploração a pasto, o gênero *Cynodon* destaca-se em relação a outras forrageiras devido ao seu elevado potencial nutricional, produzindo muitas vezes 14-16% de proteína bruta (PB) e elevada digestibilidade quando bem manejado (VILELA, 2005).

As espécies de Grama Estrela e Grama Bermuda cultivadas no Brasil foram desenvolvidas e avaliadas na sua maioria nos Estados Unidos, sendo elas: *C. dactylon* (Gramas Bermudas: Tifton 44, Tifton 78, Tifton 85, Coastcross e Florakirk) e *C. nlemfuensis* (Grama Estrela Roxa, Florona, Florico e Tifton 68 – classificada em alguns casos como *C. dactylon*). A Grama Estrela Roxa (*C. nlemfuensis*) é bastante cultivada no país, tendo sido introduzida no Brasil por produtores, sem passar por avaliação ou seleção (VILELA & ALVIM, 1996).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a variabilidade da porcentagem de proteína bruta(% PB) em 182 progênes de *Cynodon nlemfuensis*.

## **Material e Métodos**

O experimento foi conduzido na Estação Experimental de Santa Mônica – (CESM) – Valença – RJ, pertencente a Embrapa Gado de Leite. Foram avaliadas 182 progênes, provenientes de sementes coletadas em pastagens de Grama Estrela Roxa. O experimento foi avaliado em delineamento de blocos aumentados com cinco testemunhas comuns (Tifton 85, Tifton 68, Grama Estrela Roxa, Grama Estrela Porto Rico e Florico) em cada um dos 4 blocos. Cada parcela foi instalada com espaçamento de 2.5 m entre linhas e colunas.

O primeiro e o segundo corte aconteceram nos dias 18/04/2012 e 13/06/2012, respectivamente, onde apenas foram avaliadas as produções de matéria verde de forragem de cada parcela. Após cada corte foi realizada a adubação de 50 g/parcela de 20-05-20.

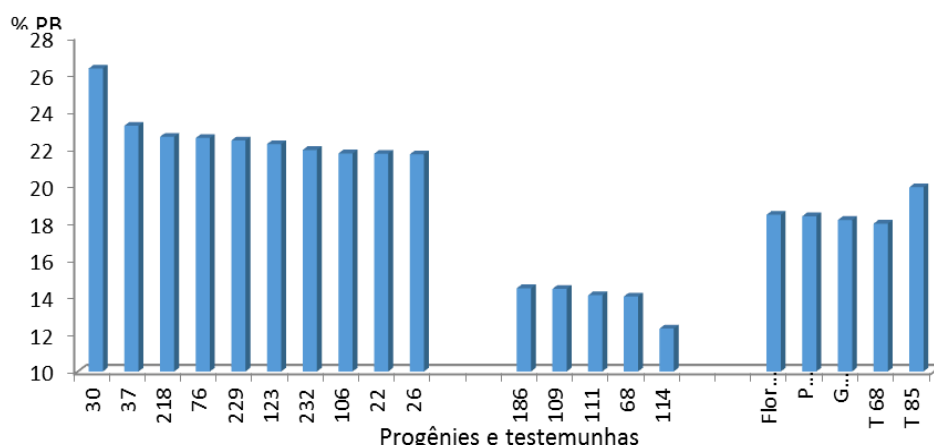
Depois de 68 dias da realização do segundo corte foi feita a avaliação em relação à produção de forragem. No terceiro corte foram coletadas amostras de matéria verde de cada parcela e após pesadas, foram colocadas em estufa a 55 °C por 72 h. As amostras secas foram moídas e avaliadas no laboratório de análises nutricionais da Embrapa Gado de Leite quanto à % PB. Os teores de PB foram determinados pelo método NIR's e as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa Genes.

## Resultados e Discussão

O gráfico abaixo apresenta os resultados das médias de % de PB das 10 melhores progênes, das cinco piores e das cinco testemunhas avaliadas. Os resultados evidenciam a grande variabilidade entre as progênes quanto à % de PB. Os dados da análise de variância mostraram que 48,35% das progênes de *C. nlemfuensis* avaliadas, superaram a média das testemunhas comuns (cultivares disponíveis para plantio). A maior média das progênes foi obtida pela progênie 30 (26,3%) e a menor pela progênie 114 (12,3 %). A variação de % de PB entre a melhor e a pior progênie foi de 14% de PB (Gráfico 1).

Em relação às testemunhas avaliadas o maior teor de % PB encontrada foi para a cultivar Tifton 85 (19,9%). Apresentando-se como a testemunha de maior média, o Tifton 85 é considerado uma cultivar de superioridade nutricional (HILL, 1998) e que proporciona maior rendimento anual de PB (1,7 t/ha) comparado a outras cultivares de *Cynodon* (POSTIGLIONI e MESSIAS 1998).

Dentre as progênes avaliadas 25,27% apresentaram % de PB superior a cultivar Tifton 85. Rodrigues et al. (2005) verificaram uma variação de 4,5% a 10,8% nos teores de proteína bruta do Tifton 85, quando receberam doses de N entre 0 e 400 kg/ha, respectivamente.



**Figura 1.** Média das 10 melhores, das cinco piores progênes de *C. nlemfuensis* e a média das cinco testemunhas comuns quanto a porcentagem de PB.

O valor do CV (%) encontrado no trabalho foi de 6,39. Tal valor de CV é considerado baixo segundo Gomes, (1982), evidenciando que as condições experimentais foram favoráveis para estimar a % PB e interpretar os resultados com confiabilidade.

Considerando-se a seleção de progênes, os melhoristas utilizam a relação  $CV_g/CV_e$  como indicador de confiabilidade da seleção. Valores da relação  $CV_g/CV_e$  acima da unidade indicam que a variação ambiental foi menor que a variação genética, mostrando que a seleção pode ser realizada com certo grau de segurança. No presente trabalho a relação  $CV_g/CV_e$  obtida foi de 1,37 mostrando que a seleção de progênes para % de PB poderá ser realizada com segurança.

## Conclusões

Existe variabilidade para porcentagem de proteína bruta entre as progênes de *Cynodon nlemfuensis* avaliadas.

Das progênes avaliadas 25,27% apresentaram valor de % de PB superior a testemunha Tifton 85.

A relação  $CV_g/CV_e$  acima da unidade proporciona confiabilidade na seleção de progênies para % PB.

## Agradecimentos

Fapemig

## Literatura Citada

GOMES, F.P. **Curso de estatística experimental**. Piracicaba, São Paulo: Distribuidora, 1982. 430 p.

VILELA, D.; ALVIM, M.J. Produção de leite em pastagem de *Cynodon dactylon* (L.) Pers, cv. Coastcross. In: **Anais do Workshop sobre o potencial forrageiro do gênero Cynodon**, Juiz de Fora, p. 77 - 91, 1996.

VILELA, D. Potencial das pastagens de *Cynodon* na pecuária de leite. In: VILELA, D., RSENDE, J.C.; LIMA J (Ed.). **Cynodon, forrageiras que estão revolucionando a pecuária brasileira**. 1. Ed. Juiz de Foras: Ed. Embrapa Gado de Leite, Brasil, p.165-176,2005.

RODRIGUES, B. H. N.; LOPES, E. A.; MAGALHÃES, J. A. **Teor de Proteína Bruta do Cynodon spp. cv. Tifton 85 sob Irrigação e Adubação Nitrogenada, em Parnaíba, Piauí**. Comunicado Técnico 171. Teresina, PI. 2005.

POSTIGLIONI, S.R., MESSIAS, D.C. Potencial forrageiro de quatro cultivares do gênero *Cynodon* na região dos Campos Gerais do Paraná. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998. p.439-441.

HILL, G.M., GATES, R.N., WEST, J.W. Pesquisa com capim bermuda cv. "Tifton 85" em ensaios de pastejo e de digestibilidade de feno com bovinos. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO DA PASTAGEM, Piracicaba, 1998. **Anais...** Piracicaba: ESALQ-USP, 1998. p.7-22

## **Avaliação do nível de expressão de genes constitutivos em úberes extracorpóreos perfundidos de vacas saudáveis abatidas**

Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>1</sup>, Isabela Fonseca<sup>2</sup>, Isabela Gomes Barreto da Mota<sup>3</sup>, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>4</sup>, Sula Abdallah Vieira Martins<sup>5</sup>, Felipe de Oliveira<sup>5</sup>, Gisele Nogueira Fogaça<sup>5</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Biotecnologia – UFJF/Juiz de Fora. email: isabellasbp@gmail.com

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento – UFV/Viçosa. e-mail: isabela\_fonseca@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Bolsista de Apoio Técnico Fapemig. Embrapa Gado de Leite. email: mottaigb@hotmail.com

<sup>4</sup>Bolsista de Pós Doutorado PNP/DC/PPS. email: alessa.siqueira@gmail.com

<sup>5</sup>Alunos de graduação em Ciências Biológicas – CES/JF. email: sula@cabanguinternet.com.br, felipe\_vieira89@yahoo.com.br, gisele\_fogaca@hotmail.com

<sup>6</sup>Embrapa Gado de Leite. email: marta.martins@embrapa.br

**Resumo:** O objetivo do grupo neste experimento foi avaliar o nível de expressão de cinco genes constitutivos (GAPDH, RPLP0, Ubiquitina, Actina, 18S RNA, HPRT) em úberes extracorpóreos perfundidos de vacas saudáveis abatidas. Para tanto, foram coletadas 6 glândulas mamárias de vacas em lactação. As glândulas foram transportadas para o Laboratório onde foram colocadas em um suporte simulando a posição no animal e perfundidas com solução *Tyrode* para hidratação. Para realização dos testes, foram coletadas amostras de tecido alveolar e do canal do teto para as análises, nos tempo 0, 1, 3, 4 e 6 h após abate. Foram testados cinco genes constitutivos, que não podem ter sua expressão alterada ao longo do tempo, em 6 úberes (3 perfundidos e 3 não perfundidos) e o resultado foi comparado entre eles. Foi identificado que os genes HPRT e GAPDH foram os mais estáveis para amostras de tecido alveolar e os genes HPRT e RPLP0 mais estáveis para amostras de canal do teto e, portanto, selecionados como controle. De forma geral pode-se verificar que nas amostras coletadas a partir de glândulas perfundidas não houve alteração da expressão dos genes ao longo do tempo enquanto nas glândulas não perfundidas a alteração foi verificada para todos os genes. Esse resultado pode indicar que o modelo extracorpóreo pode se tornar viável para estudos de expressão gênica e demais experimentos que necessitem estudos com animais.

**Palavras-chave:** expressão gênica, mastite.

**Abstract:** O objetivo do grupo neste experimento foi avaliar o nível de expressão de cinco genes constitutivos (GAPDH, RPLP0, Ubiquitina, Actina, 18S RNA, HPRT) em úberes extracorpóreos perfundidos de vacas saudáveis abatidas. Para tanto, foram coletadas 6 glândulas mamárias de vacas em lactação. As glândulas foram transportadas para o Laboratório onde foram colocadas em um suporte simulando a posição no animal e perfundidas com solução *Tyrode* para hidratação. Para realização dos testes, foram coletadas amostras de tecido alveolar e do canal do teto para as análises, nos tempo 0, 1, 3, 4 e 6 h após abate. Foram testados cinco genes constitutivos, que não podem ter sua expressão alterada ao longo do tempo, em 6 úberes (3 perfundidos e 3 não perfundidos) e o resultado foi comparado entre eles. Foi identificado que os genes HPRT e GAPDH foram os mais estáveis para amostras de tecido alveolar e os genes HPRT e RPLP0 mais estáveis para amostras de canal do teto e, portanto, selecionados como controle. De forma geral pode-se verificar que nas amostras coletadas a partir de glândulas perfundidas não houve alteração da expressão dos genes ao longo do tempo enquanto nas glândulas não perfundidas a alteração foi verificada para todos os genes. Esse resultado pode indicar que o modelo extracorpóreo pode se tornar viável para estudos de expressão gênica e demais experimentos que necessitem estudos com animais.

**Keywords:** gene expression, mastitis,

## Introdução

A mastite ou mamite caracteriza-se por uma resposta inflamatória na glândula mamária causada por alterações metabólicas e fisiológicas, traumas ou, mais frequentemente, por micro-organismos patogênicos ambientais ou contagiosos. São estimados prejuízos de aproximadamente US\$ 200 (duzentos dólares) para cada vaca acometida por mastite ao ano (CASSOL, 2010). Para realização de testes de expressão gênica relacionada a mastite é necessário a inoculação dos animais com patógenos causadores da mastite, o que pode acarretar mais prejuízos para os produtores, uma vez que a produção de leite será descartada e animais podem vir a ser sacrificados. Diante disso, o objetivo dos autores foi validar o modelo extracorpóreo para estudos de expressão gênica, por meio da avaliação da expressão de genes endógenos ao longo do tempo.

## Material e Métodos

Foram coletadas 6 glândulas mamárias provenientes de animais que seriam descartados no Campo Experimental José Henrique Bruschi (CEJHB) da Embrapa Gado de Leite, localizado em Coronel Pacheco, MG. As glândulas foram acondicionadas em caixas térmicas refrigeradas e levadas para o Laboratório de Nanotecnologia, em Juiz de Fora, onde os úberes foram fixados mimetizando a posição ortostática em um suporte. Amostras de leite foram coletas nos tempos sete, cinco e 0 dias antes do abate, para realização de testes microbiológicos e amostras da solução de perfusão foram coletadas nos tempos 0h e 6h para testes bioquímicos para verificação da viabilidade da glândula. Amostras de tecido alveolar e do canal do teto foram coletadas nos tempos 0, 1, 3, 4 e 6 h após abate, conservadas em *RNAlater*<sup>®</sup> (Ambion, Austin, TX, EUA) e levadas para o Laboratório de Genética Molecular para análise de expressão gênica. O RNA total de 240 amostras foi extraído utilizando-se o kit RNeasy Mini Kit (*Qiagen*, Valencia, CA, USA) seguindo-se as recomendações do fabricante, quantificado por espectrofotometria (NanoDrop<sup>®</sup> Technologies, Wilmington, DE, EUA) e a sua qualidade foi avaliada pelo índice RIN (*RNA Integrity Number*) após corrida em Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, EUA). Em seguida foi realizada a reação da síntese de cDNA e as reações de PCR utilizando-se o kit *SYBR Green<sup>®</sup> PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante. Foram comparadas as taxas de expressão de cinco genes constitutivos (GAPDH, RLPO, Ubiquitina, 18S RNA e HPRT) em 6 úberes (3 perfundidos e 3 não-perfundidos) coletados. Os dados obtidos durante a PCR em Tempo Real, gerados pelo equipamento *ABI Prism 7300 Sequence Detection Systems*, foram exportados para arquivos de planilhas do tipo Excel para análises. A estabilidade de expressão dos cinco genes foi avaliada pelo programa GeNorm.

## Resultados e Discussão

Os resultados obtidos nos testes microbiológicos mostraram que alguns tetos estavam contaminados, porém as amostras não foram eliminadas, uma vez que somente genes constitutivos foram analisados e estes não apresentam diferença de expressão mediante infecção. Os testes bioquímicos indicaram que as glândulas continuavam viáveis após as seis horas de perfusão. Para as amostras de tecido alveolar os genes HPRT e GAPDH foram considerados os mais estáveis e para canal do teto os genes HPRT e RPLPO, e portanto, selecionados como controle. Após reação de PCR e análises comparativas entre os resultados das amostras obtidas a partir das glândulas perfundidas e não perfundidas, os resultados foram analisados no programa REST. Para as amostras de canal do teto coletadas de glândulas perfundidas, o gene GAPDH teve sua expressão alterada ao longo do tempo, indicando que este gene não é um bom constitutivo, como

comprovado por Zhan et al. (2014) e outros autores. Nas glândulas não perfundidas houve alteração do nível de expressão dos genes Ubiquitina e 18S rRNA, o que era esperado uma vez que a glândula estava em processo de degradação. Para as amostras de tecido alveolar coletadas a partir de glândulas perfundidas, o gene 18S RNA apresentou variação da taxa de expressão nos tempos 0h e 4 h e 0h e 6h. Nas demais comparações nenhum gene teve sua expressão alterada, o que indica a eficiência da perfusão para manutenção da viabilidade da glândula. Nas glândulas não perfundidas, todos os genes apresentaram diferença de expressão em algum tempo avaliado, indicando que estava ocorrendo uma degradação das amostras ao longo do tempo.

## **Conclusões**

Resultados preliminares indicam que o modelo de glândula extracorpórea poderia ser viável para fins de estudos de expressão gênica, porém mais testes ainda serão realizados para comprovação do modelo.

## **Agradecimentos**

Ao CNPq, pelo apoio financeiro. Ao Lemos Laboratório Diagnósticos pela realização dos testes bioquímicos.

A Fapemig.

## **Literatura Citada**

CASSOL, D.M.S.; SANDOVAL, G.A.F.; PERICOLE, J.J.; GIL, P.C.N.; MARSON, F.A. **Introdução Agentes da Mastite Diagnóstico e Tratamento**. A Hora Veterinária, Ano 29, nº 175, maio/junho 2010.

ZHAN, C.; Zhang, Y.; Ma, J.; Wang, L.; Jiang, W.; Shi, Y.; Wang, Q. Identification of reference genes for qRT-PCR in human lung squamous-cell carcinoma by RNA-Seq. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, Vol. 46, nº 1, 2014.

# Padronização de metodologias para detecção de células viáveis de patógenos veiculados por produtos lácteos por meio de PCR em Tempo Real

Felipe de Oliveira Vieira<sup>1</sup>; Isabela Fonseca<sup>2</sup>; Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>3</sup>; Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>3</sup>; Sula Abdallah Vieira Martins<sup>1</sup>; Gisele Nogueira Fogaça<sup>1</sup>; João Batista Ribeiro<sup>4</sup>; Marta Fonseca Martins<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG  
felipe\_vieira89@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Resumo:** A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro, sendo o país o quarto maior produtor mundial. Estimativas apontam que em curto prazo o Brasil se tornará um dos maiores exportadores de produtos lácteos do mundo. Com isso, há necessidade de se preparar para alguns problemas que possam surgir. Estes problemas estão ligados principalmente à segurança do alimento e garantia de qualidade dos produtos. Produtos lácteos podem ser veículo de disseminação de micro-organismos patogênicos, por isso, este trabalho teve como objetivo padronizar e validar uma metodologia que possibilite a detecção de células viáveis de patógenos de modo rápido e preciso. A técnica de PCR em Tempo Real foi usada para amplificar regiões específicas do DNA genômico, extraído e purificado a partir de células dos patógenos viáveis ou inativadas por calor, tratadas ou não com EMA (intercalante de DNA), e subsequente ativação deste corante pela exposição à luz e fotólise. Contudo, o corante apresentou eficiência somente em algumas reações em que sua concentração foi igual a 100 µg/mL. Os *multiplex Salmonella* spp. + *S. aureus* e *E. coli* + *Listeria monocytogenes* foram estabelecidos com sucesso utilizando os *primers* e sondas específicos, porém sem controle interno de amplificação (IAC), pois em quantidades acima de 10 pg por reação ele impede a amplificação do DNA das bactérias.

**Palavras-chave:** Segurança do alimento, EMA, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

**Abstract:** The milk production chain is one of the most important Brazilian agribusiness, with the country's fourth largest producer. Estimates suggest that short-term Brazil will become a major exporter of dairy products in the world. Thus, there is need to prepare for any problems that may arise. These problems are mainly related to food safety and quality assurance of products. Dairy products can be a vehicle for dissemination of pathogenic micro-organisms therefore this study aimed to standardize and validate a methodology which enables the detection of viable cells of pathogens quickly and accurately. The technique of real-time PCR was used to amplify specific regions of the genomic DNA, extracted and purified from cells of viable or heat killed pathogens, treated or not and with EMA (DNA binding dye), and subsequent activation of this dye by exposure the light and photolysis. However, the dye was efficient just in some reactions with a concentration of 100 µg/mL. The multiplex *Salmonella* spp. + *S. aureus* and *E. coli* + *L. monocytogenes* were successfully established using specific probes and primers, but without internal amplification control (IAC), because in amounts above 10 pg per reaction it prevents amplification of bacterial DNA.

**Keywords:** Food safety, EMA, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*.

## Introdução

Com o crescente aumento na produção de leite no Brasil, surge uma preocupação com problemas que possam ocorrer nesta cadeia produtiva. Estes problemas estão ligados principalmente à segurança do alimento e garantia de qualidade dos produtos. É de conhecimento geral que há um grande risco de disseminação de micro-organismos patogênicos em queijos, produto muitas vezes produzido sem padrões de qualidade higiênico-sanitária. Programas de controle de qualidade microbiológica são empregados para minimizar o risco de infecção e/ou intoxicação, que são baseados na capacidade de detectar os mais variados tipos de patógenos, e constituem uma poderosa ferramenta para a implementação de medidas de vigilância sanitária, monitoramento, garantia do alimento seguro e da qualidade dos produtos.

O desenvolvimento de metodologias moleculares para a detecção de bactérias pode ajudar na melhoria da qualidade do produto. Os métodos que utilizam PCR em Tempo Real (qPCR) possibilitam um diagnóstico mais rápido e específico dos micro-organismos presentes no leite e seus derivados, por apresentar maior reprodutibilidade, sensibilidade e precisão comparado ao PCR convencional, além de reproduzir resultados quantitativos, e os métodos microbiológicos apresentam menor especificidade. A grande inovação desta metodologia é que, pela utilização de intercalantes de DNA, é possível detectar somente células viáveis do patógeno alvo, dando um diagnóstico mais rápido preciso dos patógenos presentes nestes alimentos.

O objetivo deste trabalho foi padronizar metodologias moleculares para a detecção de *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*, por meio de qPCR, com amplificação do DNA apenas de células viáveis destes patógenos e possibilitar de forma rápida a padronização e o monitoramento da produção de produtos lácteos.

## Material e Métodos

Foram utilizadas as seguintes estirpes para a padronização das reações de qPCR: *Staphylococcus aureus* ATCC 51651 CNPGL 7771, *Salmonella* IAL 1472 CNPGL 5153, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 CNPGL 5779, e *Escherichia coli* O157:H7 IAL1848 CNPGL 5785. As culturas foram crescidas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion* - DIFCO) acrescido de 0,6% de extrato de levedura a 37 °C até que a densidade ótica a 600 nm atingisse valor igual a um. Depois do crescimento as culturas foram lavadas em PBS 1X e posteriormente aliquotadas em microtubos de 1,5 mL com um volume total de 500 µL. Metade das amostras foi submetida a tratamento térmico a 100 °C durante 20 minutos, para inviabilizar as células, congeladas em nitrogênio líquido e mantidas a -80 °C até o momento do uso. A outra metade foi apenas congelada em nitrogênio líquido e mantida a -80 °C, preservando a viabilidade das células. Para ter certeza da eficiência de cada tratamento térmico, uma alíquota de cada tratamento foi colocada para crescimento em caldo BHI durante 72 horas a 37 °C, com agitação de 150 RPM, sendo realizadas leituras diárias para verificar o crescimento.

As alíquotas de 500 µL das células viáveis e inviáveis foram submetidas ao tratamento com o corante Brometo de Etídio Monoazida (EMA). Além disso, foi preparada uma suspensão de 500 µL contendo 1:1 *Salmonella*: *S. aureus* para também ser testada com este tratamento. O corante foi adicionado às amostras em concentrações de 50 µg/mL, 75 µg/mL, 100 µg/mL e 150 µg/mL e então incubadas no escuro por 5 minutos. O corante foi ativado pela exposição dos microtubos com amostras à luz halógena de 650 W durante 15 minutos a uma distância de 15 cm da lâmpada, com agitação eventual.

O DNA das células viáveis e inviáveis, tratadas e não tratadas com EMA foi extraído com o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha) com algumas modificações no protocolo estabelecido pelo fabricante. A quantificação e avaliação da qualidade do DNA de todas as extrações foram feitas por meio de espectrofotometria (Nanodrop®1000 Technologies, Wilmington, DE, EUA).



As reações de qPCR foram feitas utilizando-se o TaqMan® Universal PCR Master Mix (*Applied Biosystems*, Foster City, CA, EUA), de acordo com as recomendações do fabricante e os *primers* e sondas utilizados foram desenhados a partir de sequências depositadas no GenBank (FRICKER et al. 2007, ORAVCOVÁ et al., 2006, PIKNOVÁ et al. 2005, SHORTLE, 1983, WANG et al., 2007,). Cada reação foi feita em duplicata em placas ópticas de reação de 96 poços, seladas com filme adesivo óptico e amplificadas no ABI Prism 7000 *Sequence Detection Systems* (*Applied Biosystems*). Cada reação teve o volume final de 25  $\mu$ L, sendo a amplificação realizada com 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos (desnaturação) e 60 °C por um minuto (anelamento e extensão). Além de utilizar DNA das bactérias de interesse, *primers* e sondas específicos nos testes, foram feitas também reações de qPCR em *multiplex*, com DNA apenas de células viáveis de duas espécies de bactérias por vez junto com o plasmídeo pUC 18 como controle interno de amplificação (IAC) para garantir a ausência de inibidores de PCR nas amostras. Inicialmente foram utilizadas cinco concentrações de IAC (2 pg, 10 pg, 100 pg, 1 ng e 2 ng por reação) para avaliar a sua interferência na reação. E, finalmente, para se determinar quais seriam as melhores condições para as reações em *multiplex*, foram realizados testes envolvendo todas as possíveis combinações das bactérias duas a duas, tanto com, quanto sem a presença do IAC.

## Resultados e Discussão

Foi observada ausência de crescimento bacteriano das amostras tratadas a 100 °C por 20 min no meio ágar BHI mesmo após 72 h de incubação a 37 °C demonstrando que o tratamento térmico foi eficiente para a inativação das bactérias. O tratamento com EMA tem como finalidade impedir a amplificação do DNA tratado com este corante, pois ele penetra pelos poros da membrana e/ou parede celular danificada de células mortas e se intercala entre as duplas fitas de DNA, assim, ele impede que a DNA polimerase passe pela fita molde. Em algumas reações de qPCR, a concentração de 100  $\mu$ g/mL do corante impediu a amplificação do DNA de células inviáveis de *S. aureus*. Todas as outras reações com diferentes concentrações de EMA apresentaram amplificação, contudo, há uma interferência na quantidade amplificada.

As concentrações de IAC acima de 2 pg impediram a amplificação do DNA das bactérias. Quando os testes para padronização das reações de PCR em *multiplex* incluíram as concentrações de 10 pg, 100 pg, 1 ng e 2 ng de IAC, somente o DNA deste amplificou, mesmo com maiores concentrações de DNA das bactérias alvo. Assim, dois *multiplex* foram estabelecidos (*Salmonella* + *S. aureus* e *E.coli* + *Listeria*), porém, apenas na ausência de IAC.

A próxima etapa do projeto será estabelecer o protocolo para o tratamento com EMA, como concentração do corante, distância entre os microtubos com as amostras e a fonte de luz, tempo de incubação e exposição à luz, para que este não permita a amplificação do DNA de nenhuma célula inviável. Também será testado o tratamento com outro intercalante, o corante PMA (*propidium monoazide*) o qual age basicamente da mesma forma que o EMA, mas pode apresentar resultados diferentes. Estabelecidos, estes protocolos serão aplicados em queijo Minas Padrão e de Coalho encontrados no mercado.

## Conclusões

Como o IAC apresentou uma grande interferência na amplificação, não será mais utilizado junto aos *multiplex* das reações. O trabalho está em andamento para otimizar o protocolo para a maior eficiência da interação do corante com as moléculas de DNA de células não viáveis.

## Agradecimentos

A Fapemig

## Literatura citada

FRICKER, M.; MESSELHAUBER, U.; BUSCH, U. SHERER, S. EHLING-SHULTZ, M. Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent foodborne outbreaks. **Applied and Environmental Microbiology**, n.73, p. 1982-1998, 2007.

HOOFFAR, J.; COOK, N.; MALORNY, B.; WAGNER, M.; MEDICI, D.; ABDULMAWJOOD, A.; FACH, P. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 5835, 2003.

MALORNY, B.; PACCASSONI, F., FACH, P., BUNGE, C., MARTIN, A., HELMUTH, R., Diagnostic real-time PCR for the detection of *Salmonella* in food. **Applied Environmental Microbiology**, v.70, p. 7046-7052, 2004.

MALORNY, B.; WAGNER, M. Detection of *Enterobacter sakazakii* Strains by Real-Time PCR. **Journal of Food Protection**, v. 68, p. 1623-1267, 2005.

ORAVCOVÁ, K. Detection and quantification of *Listeria monocytogenes* by 5' –nuclease polymerase chain reaction targeting the *actA* gene. **Letters in Applied Microbiology**, n.42, p.15-18, 2006

PIKNOVÁ, L.; KACLIKOVÁ, E.; PANGALLO, D.; POLEK, B.; KUČHTA, T. Quantification of *Salmonella* by 5' –nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. **Current Microbiology**, n50, p. 38-42, 2005.

SHORTLE, D. A genetic system for analysis of staphylococcal nuclease. **Gene**, n.22, p181-182, 1983.

WANG, L.; LI, Y.; MUSTAPHA, A. Rapid and simultaneous quantitation of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* and *Shigella* in ground beef by multiplex real-time PCR and immunomagnetic separation. **Journal of Food Protection**, n. 70, p.1366-1372, 2007.

WANG, S.; LEVIN, R.E. Discrimination of viable *Vibrio vulnificus* cells from dead cells in real-time PCR. **Journal of Microbiology Methods**, v. 64, p. 1-8, 2006.

# **Padronização da detecção do caseínomacropeptídeo em leite bovino como indicativo de fraude pela adição de soro através da eletroforese microfluídica**

Fogaça, GN<sup>1</sup>; Santos, ASO<sup>2</sup>; Martins, SAV<sup>1</sup>; Vieira, FO<sup>1</sup>; Motta, IGB<sup>1</sup>; Fonseca, I<sup>3</sup>; Pinto, ISB<sup>3</sup>; Martins, MF<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CES/JF, Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Viçosa, UFV, Viçosa, MG

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Resumo:** O leite bovino é fundamental para a alimentação humana por conter altos valores proteicos e de minerais, predominantemente o cálcio. Muitas especulações envolvem laticínios com relação a alterações no leite que além de aumentar o seu volume geram maiores lucros para os produtores ocasionando uma fraude econômica, onde há intenção de modificar o produto para benefício próprio. Com isso, cada vez mais tem aumentado a preocupação com o controle da qualidade do leite e seus derivados. Sendo assim, no Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) publicou uma metodologia oficial para detecção de fraude em leite, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), baseada na determinação do caseínomacropeptídeo (CMP), presente somente em soro de queijo, uma vez que a adição inadequada deste subproduto ao leite é a forma mais utilizada nos casos de adulteração. Metodologias alternativas vêm sendo realizadas em alguns estudos e têm resultado em dados satisfatórios. Neste trabalho, foram testadas amostras de leite pasteurizado com adição de soro nos níveis 0% (controle negativo); 2,5%; 20%; 50%; 100% (controle positivo) e CMP padrão da Sigma®. Para isolamento do caseínomacropeptídeo foi utilizada a técnica de extração com o uso de ácido tricloroacético e posteriormente, foram submetidas à eletroforese em mini-gel SDS-PAGE (Amersham ECL Gel Box) e eletroforese microfluídica (Agilent 2100 Bioanalyzer), onde se obteve resultados preliminares bastante satisfatórios.

**Palavras-chave:** CMP, fraude em leite, soro de queijo.

**Abstract:** The bovine milk is fundamental for feeding the human to contain high protein and calcium values. Many speculations involve dairy in relation to changes in milk and increase its volume generate higher profits for producers causing an economic fraud where there is an intention to modify the product for their own benefit. With that increasingly has increased concern about the quality control of milk and its derivatives. So, in Brazil, the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa) published an official methodology for detecting fraud in milk, high performance liquid chromatography (HPLC), based on determining the caseinmacropeptide (CMP), only present in whey protein, since the inadequate addition this byproduct most widely used form in cases of adulteration. Alternative methodologies have been used in some studies and have resulted in satisfactory data. In this work, pasteurized milk samples were tested with addition of whey levels of 0% (negative control), 2.5%, 20%, 50%, 100% (positive control) and standard CMP Sigma®. For the isolation of caseinmacropeptide extraction technique using trichloroacetic acid was used, and then were subjected to electrophoresis in mini-SDS-PAGE gel (Amersham ECL Gel Box) and microfluidic electrophoresis (Agilent 2100 Bioanalyzer), where preliminary results obtained quite satisfactory.

**Keywords:** CMP, fraud in milk, whey protein.

## Introdução

O leite bovino é considerado um alimento de extrema importância devido ao seu grande valor nutricional e por este motivo é um produto bastante consumido pela população mundial. Deste modo, o interesse quanto à qualidade do leite tem se tornado cada vez mais expressivo. Sabe-se que o leite passa por inúmeras transformações antes de chegar à mesa do consumidor e muitas delas, são caracterizadas como adulteração e falsificação já que as propriedades originais do produto são modificadas.

Existem várias formas para alteração do leite sendo a mais comum a adição de soro de queijo. Este subproduto, muitas vezes, é descartado pelos laticínios, o que o torna o principal ingrediente para o aumento do volume do leite produzido, proporcionando maior lucro ao produtor, mas, este ato enquadra-se como fraude econômica onde existe a intenção de alterar o produto para benefício do produtor. Entretanto, pelo seu alto valor proteico, o soro vem sendo aproveitado de forma legal em derivados lácteos, porém estes produtos devem constar em seus rótulos a informação de bebida láctea.

A fim de buscar a qualidade do leite e evitar casos de adulteração no produto, o Mapa, no Brasil em 2006, estabeleceu uma metodologia oficial para a identificação de fraude em leite com soro de queijo, baseada na quantificação e determinação de caseinomacropéptido (CMP) por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). No entanto, outros métodos alternativos ao HPLC vêm sendo desenvolvidos, como a determinação do ácido siálico, eletroforese em SDS-PAGE entre outras visando rapidez, menor custo e maior eficiência nos resultados. O CMP é um macropéptido presente no soro de queijo liberado como produto da quebra da kapa-caseína pela ação da enzima quimosina ou renina durante a fabricação do queijo, mas também pode ser oriundo de enzimas termoestáveis produzidas por microrganismos psicotróficos, o que pode acarretar em interferências nas análises. Contudo, por ser um composto presente somente no soro, o CMP é um forte indicativo de fraude em leite.

Sendo assim, este trabalho teve por objetivo padronizar a técnica de eletroforese microfluídica para a detecção do CMP em amostras com simulações de fraude em leite bovino com soro de queijo, para futuras aplicações como técnica alternativa e complementar à metodologia oficial.

## Material e Métodos

Foram utilizadas amostras de leite pasteurizado e soro de queijo para o preparo das simulações de fraude, nos seguintes níveis: 0%; 2,5%; 20% e 50%. As amostras foram armazenadas a -80 °C. Foi também utilizado o caseinoglicopeptídeo padrão do Sigma®; esse CMP padrão foi diluído em água ultrapura milliQ® na proporção 2 mg/mL.

Um volume de 50 mL das amostras foi utilizado para a extração do CMP. Para o isolamento do CMP foi utilizado o método de extração com o uso de ácido tricloroacético (TCA) onde em um bquer contendo 50 mL de amostra, foram adicionados gota a gota e sob agitação lenta, 25 mL de TCA a 24%, inferindo numa concentração final a 8% de TCA. Tal mistura foi mantida em repouso, em temperatura ambiente, por 1 hora. Posteriormente, essa solução foi filtrada em filtro Whatman™ nº 42 para a separação do precipitado e sobrenadante.

Em seguida, foi adicionado 8 mL de TCA à 50% em 35 mL do filtrado. A solução foi homogeneizada por inversão e mantida na geladeira a 4 °C por 1 hora. Após esse período, realizou-se centrifugação da solução resultante durante 10 minutos a 5.000 x g na temperatura 4 °C (Centrífuga Megafuge 11R, Thermo Scientific) para a formação do pelete. O sobrenadante foi descartado e o pelete lavado duas vezes com 10 mL de uma solução de éter-etanol (1:1) e centrifugado a 5.000 x g por 10 min à temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pelete foi seco em temperatura ambiente. Assim que o precipitado estava completamente livre de resíduo de éter-etanol, foi ressuspenso com 1,5 mL de Tampão Tris-HCl 0,05M EDTA 1mM, pH 7,2 e armazenado a -20 °C.

As amostras de CMP extraídas foram diluídas em tampão de amostra SDS 2X na proporção 1:1, aquecidas a 95 °C por 5 minutos e analisadas pela eletroforese em mini-

gel SDS-PAGE utilizando Amersham ECL Gel Box - GE Healthcare Life Sciences. Utilizou-se um padrão de peso molecular de 12.000 – 225.000 kDa (Amersham Full-Range Rainbow Molecular Weight Markers, GE Healthcare Life Sciences). Então, o marcador e as amostras preparadas foram aplicadas no gel que depois foi corado por no mínimo 14 horas à temperatura ambiente com a coloração própria para CMP, que foi anteriormente preparada com o corante Coomassie® Brilliant Blue R-250 na concentração 0,5% (w/v) dissolvido em 50% de etanol (v/v) e 12% de ácido tricloroacético.

As amostras de CMP extraídas também foram analisadas pela eletroforese microfluídica utilizando a metodologia da condição redutora com Dithiothreitol (DTT) e o Kit Agilent Protein 80 no equipamento Agilent 2100 Bioanalyzer, conforme recomendações do fabricante.

## **Resultados e Discussão**

Na eletroforese em mini-gel observou-se uma banda com aproximadamente 20 kDa nas amostras com porcentagem de fraude com soro de queijo a 2,5%, 20%, 50% e CMP padrão. Esta banda pode ser um indicativo de CMP por estar alinhada com o padrão de massa molecular entre 17 kDa e 24 kDa, já que o peso molecular relatado em SDS-PAGE está em torno de 20,9 kDa, o que está dentro do intervalo dos valores do marcador molecular padrão citados anteriormente.

Com relação à eletroforese microfluídica, observou-se um pico entre 28 kDa e 30 kDa nas mesmas amostras utilizadas para o SDS-PAGE, valores estes que não são comuns para as caseínas do leite tampouco para as proteínas do soro, quando comparados com os valores de massa molecular descritos com a utilização desta metodologia. No entanto, para a técnica de eletroforese microfluídica, não existem relatos na literatura evidenciando o perfil proteico e o peso molecular do CMP, mas a banda identificada nessa análise não coincide com o peso molecular (kDa) das principais proteínas do leite, as caseínas e as proteínas do soro. A próxima etapa do trabalho será aprimorar o protocolo de extração de CMP e realizar novos testes em amostras cegas, e ainda, confrontar com os resultados obtidos com a metodologia oficial brasileira (HPLC) e com a metodologia convencional.

## **Conclusões**

Os resultados preliminares na detecção de CMP pela técnica de eletroforese microfluídica foram satisfatórios quando confrontados com a metodologia convencional de SDS-PAGE, mas será necessário aprimorar o protocolo de extração e as análises para validar o método para a aplicação em amostras cegas.

## **Agradecimentos**

A Fapemig

## **Literatura Citada**

ANEMA, S. G. The use of “lab-on-chip” microfluidic SDS electrophoresis technology for the separation and quantification of milk proteins. **International Dairy Journal**. v. 9, p. 198-204, 2009.

EGITO, et. al., Milk-clotting activity of enzyme extracts from sunflower and albizia seeds and specific hydrolysis of bovine k-casein. **International Dairy Journal**. v. 17, p. 816-825, 2007.

GALINDO-AMAYA, L. M.; VALBUENA-COLMENARES, E.; ROJAS-VILLARROEL, E. Estandarización de la detección del glicomacropéptido por PAGE-SDS como índice de adulteración de leche. **Revista Científica, FCV-LUZ**, v. 16, n. 3, p. 308-314, 2006.

# **Produtividade de forragem e porcentagem das folhas de populações de *Brachiaria ruziziensis*<sup>1</sup>**

## **Productivity of forage and percentage of leaves *Brachiaria ruziziensis* populations**

Larissa Figueiredo Aguiar Serra<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>3</sup>, Bruna de Paula Dias<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq e Fapemig

<sup>2</sup>Bolsista de iniciação científica, estudante de graduação em Ciências Biológicas, CES, Juiz de fora/MG

<sup>3</sup>Pesquisador, Embrapa a Gado de Leite, Juiz de Fora/MG

**Resumo:** O objetivo do presente trabalho foi avaliar a produtividade de forragem e a porcentagem das folhas de populações de *Brachiaria ruziziensis*. Foram avaliadas 10 populações, obtidas do programa de melhoramento genético, conduzido na Embrapa Gado de Leite, juntamente com as cultivares Kennedy (*B. ruziziensis*) e Marandu (*B. brizantha*) utilizadas como testemunhas. Foram utilizados os dados do corte realizado em janeiro de 2014, quando as plantas se encontravam com 30 dias de idade. Os resultados evidenciaram elevada produtividade de forragem das populações de *B. ruziziensis*. Cinco populações testadas apresentaram produtividade de folhas verdes superior à cultivar Kennedy.

**Palavras-chave:** melhoramento de forrageira.

**Abstract:** The aim of the study was to evaluate the forage productivity and percentage of leaves of forage *Brachiaria ruziziensis*. Ten populations, obtained from the breeding program, conducted at Embrapa Dairy Cattle were evaluate, along with Kennedy (*B. ruziziensis*) and Marandu (*B. brizantha*) used as control. We use date cutoff conducted in January 2014, when the plants 30 days old. The results showed high forage productivity of populations of *B. ruziziensis*. Five populations tested showed higher yield of green leaf cultivar Kennedy.

**Keywords:** forange breeding.

## **Introdução**

O cultivo de forrageiras no Brasil apresenta importante papel no cenário pecuário constituindo a principal fonte de alimento dos rebanhos brasileiros. A disponibilidade de forragem de qualidade durante todo o ano é de fundamental importância para possibilitar que os animais possam expressar todo o seu potencial produtivo (SOUZA SOBRINHO et al., 2005).

Entre as forrageiras mais cultivadas no país destaca-se o gênero *Brachiaria* que por apresentar elevado potencial de produção, boa adaptação aos solos ácidos e de baixa fertilidade, ocupa maior área de plantio. A espécie *B. ruziziensis* é a única espécie cultivada no Brasil totalmente diploide. Apresenta reprodução sexual permitindo a seleção e recombinação de materiais superiores (SOUZA SOBRINHO et al., 2005).

De forma geral os programas de melhoramento de forrageiras buscam selecionar materiais com melhor adaptação as diferentes condições ambientais, considerando a estabilidade e a produção de forragem (SOUZA SOBRINHO et al., 2005). A porcentagem de folhas presente na forragem produzida é de extrema importância para as novas cultivares forrageiras, uma vez que as folhas apresentam melhor valor nutritivo e são consumidas preferencialmente pelos animais.

Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a produtividade de forragem e a porcentagem das folhas de populações de *Brachiaria ruziziensis*.

## Material e Métodos

O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco (MG). Foram avaliadas 10 populações de *Brachiaria* obtidas do programa de melhoramento genético, conduzido pela empresa, juntamente com os cultivares Kennedy (*B. ruziziensis*) e Marandu (*B. brizantha*) utilizadas como testemunhas.

Foram utilizados os dados de corte realizado em janeiro de 2014, quando as plantas se encontravam com 30 dias de idade, para avaliar a produtividade de forragem verde e a porcentagem das folhas. O experimento foi implantado em outubro de 2013, utilizando delineamento de blocos casualizados, com três repetições e parcelas de seis linhas de 4 m de comprimento cada, com espaçamento de 1 m entre linhas e de 0,5 m entre plantas de uma mesma fileira. Em dezembro de 2013 realizou-se um corte de uniformização das plantas e em janeiro, quando as plantas apresentavam aproximadamente 30 dias de crescimento, foi realizado o corte de avaliação.

O corte das plantas foi realizado a 5 cm do solo, a forragem foi pesada e tomou-se amostras de cada parcela para a separação e pesagem de caules e folhas, com o intuito de obter a porcentagem de folhas verdes de cada material. A associação da produtividade total de forragem e a porcentagem de folhas permitiu estimar a produtividade de folhas verdes das diferentes populações de *B. ruziziensis*.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o modelo de blocos casualizados e as medias foram comparadas, quando necessário, pelo teste de Scott-Knott.

## Resultados e Discussão

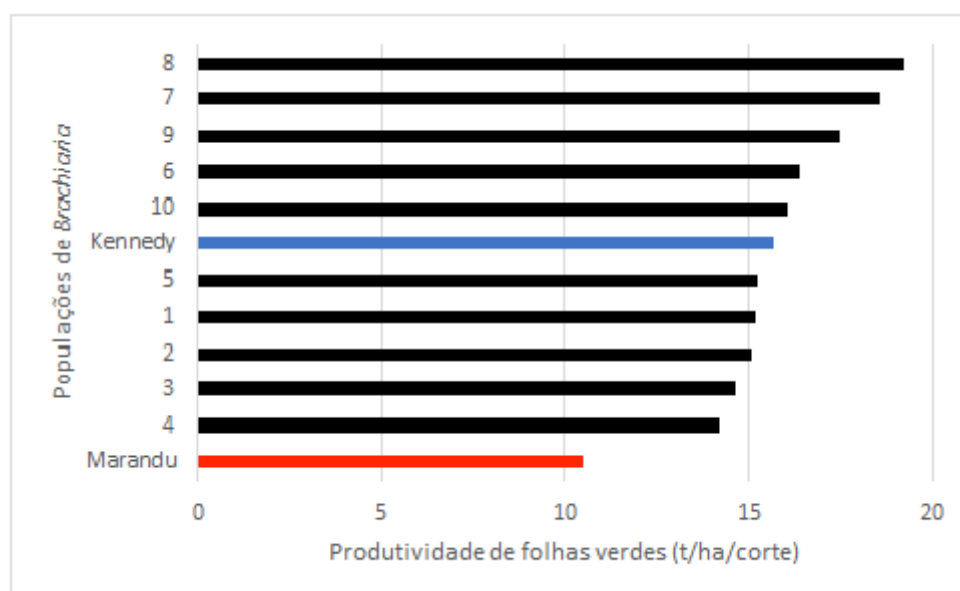
Os resultados das análises de variância mostraram diferenças significativas para a produtividade total de forragem e de folhas. Para a porcentagem das folhas não foram detectadas diferenças relevantes entre as populações de *Brachiaria* (Tabela 1 e Figura 1). A produtividade de forragem das 10 populações de *B. ruziziensis* testadas foi semelhante à cultivar Kennedy, com média de 46,8 t de forragem/ha. Todos os materiais de *B. ruziziensis* superaram a cultivar Marandu (15,7 t de forragem verde/ha), evidenciando o potencial produtivo dos genótipos testados.

Considerando-se a produtividade de folhas verdes, cinco populações de *B. ruziziensis* superaram a cultivar Kennedy (Figura 1). O melhor material produziu cerca de 23% mais folhas que esta testemunha, o que corresponde a quase 3,8 t de folhas verdes/ha/corte. Em relação à Marandu, que é a cultivar de braquiária que ocupa maior área no Brasil, a superioridade foi de 83% ou 8,7 t de folhas verdes/ha. Esses resultados evidenciam o grande potencial produtivo dos materiais testados e permitem antever a possibilidade de obtenção e lançamento de novas cultivares de *B. ruziziensis* no futuro próximo. Entretanto, há necessidade de continuidade das avaliações dos materiais testados para confirmação dos resultados e verificação do comportamento deles ao longo do tempo.

**Tabela 1.** Produtividade verde de forragem (PV) e porcentagem de folhas (%folhas) de populações de *Brachiaria ruziziensis*, em Coronel Pacheco(MG).

Trat	PV (t/ha)*	%folhas
1	46.5a	32.53a
2	43.3a	34.87a
3	43.9a	33.63a
4	43.7a	32.60a
5	46.1a	33.14a
6	47.7a	34.47a
7	49.7a	37.38a
8	53.5a	36.05a
9	46.0a	37.69a
10	48.4a	33.10a
Kennedy - <i>B. ruziziensis</i>	49.9a	31.83a
Marandu - <i>B. brizantha</i>	31.5b	34.14a

\* Médias seguidas por letras diferentes nas colunas indicam diferenças significativas pelo teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).



**Figura 1.** Médias de produtividade de folhas verdes (t de forragem/ha) das 10 populações de *Brachiaria ruziziensis*.

## Conclusões

As populações de *Brachiaria* apresentaram boa produtividade de forragem em relação as melhores cultivares utilizadas no Brasil.

A melhor população de *B. ruziziensis* produziu cerca de 23% e 83% mais folhas verdes do que as cultivares Kennedy e Marandu, respectivamente.

## Agradecimentos

A Fapemig.

## Literatura citada

SOUZA SOBRINHO, F., LÉDO, FRANCISCO JOSÉ DA SILVA, KOPP, M.M. Estacionalidade e estabilidade de produção de forragem de progênies de *Brachiaria ruziziensis*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.35, p.684 - 691, 2011.



SOUZA SOBRINHO, F., CARNEIRO HELOISA, LEDO, FRANCISCO JOSÉ DA SILVA, SOUZA, FLAVIO FARIA. Produtividade e qualidade e forragem de *Brachiaria* na Região Norte Fluminense. **Pesquisa Aplicada e Agrotecnologia**, v.2, n3, p.07 -12, 2009.

SOUZA SOBRINHO, F.; LÉDO, F.J.S.; KOPP, M.M; PEREIRA, A.V.; SOUZA, F.F.; Melhoramento de gramíneas forrageiras na Embrapa Gado de Leite. In: EVANGELISTA, A.R.; SOUZA, F.F. (Eds.). **Forragicultura e pastagem**. Lavras: UFLA, 2009. p.98-111.

# **Emissão de metano entérico por novilhas leiteiras Holstein, Gyr e F1 Holandês x Gir**

## **Enteric methane emission by Holstein, Gyr and F1 Holstein x Gyr dairy heifers**

Maysa Andrade<sup>1</sup>, Tainá Silvestre<sup>2</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>3</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>3</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do curso de Farmácia – UFJF. Bolsista de Iniciação Científica - PIBIC/Fapemig – Juiz de Fora/MG

<sup>2</sup>Doutoranda em Nutrição e Produção da Universidade de São Paulo – USP, Pirassununga, Brasil, Bolsista da Capes

<sup>3</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora/MG

**Resumo:** O objetivo deste trabalho foi determinar a emissão de metano entérico por novilhas leiteiras de raças puras (Gyr e Holandês) e mestiça (F1 Holandês-Gyr), submetidas a diferentes níveis de consumo. Foram avaliados os efeitos sobre o consumo de matéria seca correlacionada com a produção diária de metano (CH<sub>4</sub>), sendo as dietas experimentais calculadas com base na ingestão de manutenção prevista pela NRC (2001). Adotou-se o delineamento experimental inteiramente casualizado em esquema fatorial (raça de gado x nível de consumo). Foi utilizada a técnica de ensaio do metabolismo em sistema *tié-stall* provido de bebedouros e comedouros individuais. Os dados foram submetidos à análise de variância, os meios foram comparados pelo teste de Tukey (P < 0,05) e um estudo de correlação foi feito por meio do coeficiente de correlação de Pearson. Foi observado que o consumo de matéria seca foi positivamente correlacionada com a produção diária de CH<sub>4</sub> (r = 0,73 , p < 0,01) e que não houve variações significativas entre raças para a emissão de CH<sub>4</sub> por quilograma de ganho de peso metabólico.

**Palavras-chave:** Gás de efeito estufa, metano, ruminantes, aquecimento global.

**Abstract:** The objective of this study was to determine the enteric methane emissions by dairy heifers purebreds (Gyr and Holstein) and mestizo (F1 Holstein-Gyr), subjected to different levels of consumption. Effects on dry matter intake correlated with daily production of methane (CH<sub>4</sub>) were evaluated experimental diets were fed in different amounts, based on maintenance intake predicted by NRC (2001). Experimental design was completely randomized in factorial (breed of cattle x level of consumption). Assay technique metabolism in the tie- stall with individual feed bunks and drinkers. Data were submitted to analysis of variance, the means were compared using Tukey's test (P < 0.05) and a correlation study was done using the Pearson's correlation coefficient. It was observed that the dry matter intake was positively correlated with the daily CH<sub>4</sub> production (r = 0.73 , p < 0.01) and there was no significant variation between races for the emission of CH<sub>4</sub> per kilogram of metabolic body weight gain .

**Keywords:** Greenhouse gas effect, methane, ruminants, global warming.

## **Introdução**

A agropecuária tem enfrentado uma situação desafiadora. A ascensão desse setor é crescente ao mesmo tempo em que a demanda por alimentos aumenta exponencialmente, em função do crescimento da população mundial e do seu poder aquisitivo. De encontro a essa ascensão, questões ambientais relacionadas principalmente à emissão de gases de efeito estufa (GEE) pressionam o setor para se tornar mais eficiente na exploração dos recursos naturais.

O metano ( $\text{CH}_4$ ) é um gás de efeito estufa considerado o segundo maior contribuinte para o aquecimento da terra, ficando atrás somente do dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ). O aumento de sua concentração na atmosfera está intimamente ligado com a expansão mundial da população humana, visto que as principais fontes emissoras, além da fermentação entérica são os aterros sanitários, uso de combustíveis fósseis e práticas agrícolas.

Este cenário somado à pressão da sociedade por sistemas de produção sustentáveis insere o Brasil como um dos países com grande potencial para suprir parte da demanda crescente de produtos de origem animal no mundo, o que acarretará no avanço da pecuária sobre novas áreas. Desta forma, a aplicação do conceito de Nutrição de Precisão, que visa à eficiência máxima e ao mínimo impacto ambiental, e a geração de métricas relacionadas à nutrição de bovinos leiteiros, contribuirão para que as métricas de sustentabilidade do setor produtivo sejam estabelecidas, bem como para tais metas sejam alcançadas.

O objetivo do presente trabalho foi é determinar a emissão de metano entérico por novilhas leiteiras de raças puras (Gir e Holandês) e mestiça (F1 Holandês-Gir), submetidas a diferentes níveis de consumo.

## **Material e Métodos**

O ensaio metabólico de novilhas leiteiras de raças puras e mestiça foi conduzido nas baias experimentais e no Laboratório de Bioenergética do Campo Experimental José Henrique Bruschi da Embrapa Gado de Leite, em Coronel Pacheco – MG. Foram usadas trinta e seis novilhas leiteiras: 12 da raça Holstein, 12 F1 Holandês x Gir e 12 da raça Gir, pesando 200 kg, em média.

As dietas experimentais foram calculadas em quantidades diferentes, com base na ingestão de matéria seca prevista pela NRC (2001): 2 vezes a ingestão para manutenção (Nível Alto); 1,5 vez à ingestão para manutenção (Nível moderado); e Nível baixo, uma vez o consumo para manutenção. Os animais foram alimentados com volumoso e concentrado na forma de ração completa, duas vezes por dia e a quantidade foi ajustada de acordo com o peso vivo do animal.

O hexafluoreto de enxofre ( $\text{SF}_6$ ) foi utilizado para medir a emissão de  $\text{CH}_4$  entérico, avaliado ao longo dos últimos cinco dias do período experimental de 90 dias, a cada 24 horas, após a refeição matinal. As concentrações de  $\text{CH}_4$  e  $\text{SF}_6$  foram determinadas por cromatografia de fase gasosa e, a partir da taxa conhecida de liberação de  $\text{SF}_6$  no rumen e das concentrações de  $\text{CH}_4$  e  $\text{SF}_6$  nas amostras medidas de gás, o fluxo de  $\text{CH}_4$  liberado pelo animal foi calculado em relação ao fluxo de  $\text{SF}_6$  medido.

O delineamento experimental foi inteiramente ao acaso, em esquema fatorial (raça de gado x nível de consumo). Os dados foram submetidos à análise de variância, os meios foram comparados pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ) e um estudo de correlação foi feito por meio do coeficiente de correlação de Pearson.

## **Resultados e Discussão**

Os resultados mostram que o consumo de matéria seca (CMS) foi positivamente correlacionada com a produção diária de  $\text{CH}_4$  ( $r = 0,73$ ,  $p < 0,01$ ). No nível elevado de ingestão, novilhas Holstein apresentaram maior ( $P < 0,05$ ) emissão de  $\text{CH}_4$  por unidade de peso metabólico (3,7 g/dia) e maior ( $P < 0,05$ ) emissão de  $\text{CH}_4$  por quilograma de matéria seca ingerida (48,3 g/kg). Neste mesmo nível de consumo, Gir e F1 Holandês x Gir novilhas demonstrou semelhante ( $P > 0,05$ ) emissão de  $\text{CH}_4$  por unidade de peso metabólico (2,0 e 2,1 g/dia, respectivamente) ou por quilograma de ingestão de matéria seca (29,4 e 28,2 g/kg, respectivamente). Independente do nível de ingestão não houve variações significativas entre raças para a emissão de  $\text{CH}_4$  por quilograma de ganho de peso metabólico.

Os valores médios de emissão foram de 0,2, 0,3 e 1,6 g/Kg em alta, moderada e baixo nível de consumo, respectivamente.

## Conclusões

Os parâmetros analisados avaliando a nutrição de precisão das novilhas leiteiras de raças puras e mestiça mostraram a ausência de variação significativa entre raças para a emissão de metano por quilograma de ganho de peso metabólico.

## Agradecimentos

À Embrapa Gado de Leite por todas as oportunidades de desenvolvimento.

Aos pesquisadores Fernanda Samarini Machado e Luiz Gustavo Ribeiro Pereira por todas as chances de crescimento.

À pesquisadora Mariana Magalhães Campos, em especial, por todo o apoio e compreensão.

Aos funcionários do Laboratório de Cromatografia: Ernando Motta, Hernani Barbosa e Marco Antônio, pelo carinho e atenção.

A Fapemig

## Literatura Citada

ALVIM, M. J.; PACIULLO, D. S. C.; CARVALHO, M. M.; AROEIRA, L. J. M.; CARVALHO, L. A.; NOVAES, L. P.; GOMES, A. T.; MIRANDA, J. E. C.; RIBEIRO, A. C. C. L. Sistema de produção de leite com recria de novilhas em sistemas silvipastoris. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/LeiteRecriadeNovilhas/racas.htm>>. **Embrapa Gado de Leite**. Acesso em 07/jan/2014.

FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. **FAO statistical databases**. Rome, 2006. Disponível em <<http://faostat.fao.org>>. Acesso em 4 de janeiro de 2014.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC Nutrient requirements of dairy cattle. Sixth Rev. Ed. Update, Washington, D.C.: **National Academic of Sciences**, 1988. 158p.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL - NRC. Nutrient requirements of beef cattle. 7ed. Washington, D.C.: National Academic Press, 1996. 242p. NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Nutrient requirements of beef cattle – NRC. Sixth Rev. Ed. Washington, D.C.: **National Academic of Sciences**, 1984.

ZOTTI, C. A.; PAULINO, V. T. **Metano na produção animal: emissão e minimização de seu impacto**. Ecologia de Pastagens, Curso de Pós-graduação em Produção Animal Sustentável. Instituto de Zootecnia, APTA/SAA, 2009.

# Coletânea dos Anais dos Workshops de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite



## XIV Workshop de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite

### Trabalhos:

#### **1. Diversidade Molecular Estimada por Meio de Marcadores Microsatélites em Populações de *Lolium Multiflorum***

Autores: Fernando Rodrigues de Oliveira, Raquel Moraes de Paiva, Andrea Mittelman, Ana Luisa Sousa Azevedo

#### **2. Seleção de Híbridos Interespecíficos Hexaploides e genótipos de capim-elefante quanto à resistência à *Mahanarva spectabilis***

Autores: Antônio Marcos Oliveira Toledo, Alexander Machado Auad, Tiago Teixeira de Resende, Marcy das Graças Fonseca, Juarez Campolina Machado, Francisco José da Silva Lédo

#### **3. Composição morfológica, acúmulo de forragem e desempenho de novilhas em sistema silvipastoril**

Autores: Clóvis de Alencar Freitas Faria, Priscila Beligoli Fernandes, Angelo Hebert Moreira Araújo, Jorge Fellipe Rodrigues da Costa Santos, Domingos Sávio Campos Paciullo

#### **4. Avaliação de cultivares de capim-elefante e híbridos interespecíficos de capim-elefante e milheto para uso forrageiro**

Autores: Michelli Andrade Tavares, Francisco José da Silva Lédo, Juarez Campolina Machado, Ana Luisa Sousa Azevedo, Antonio Vander Pereira, Fausto de Souza Sobrinho, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Alexander Machado Auad

#### **5. Avaliação de populações de *Brachiaria ruziziensis* em experimentos de VCU.**

Autores: Bruna de Paula Dias, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Fausto de Souza Sobrinho, Thailany Laís de Oliveira

#### **6. Produtividade de forragem de clones melhorados de *B.ruziziensis* no inverno**

Autores: Thailany Lais de Oliveira, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites, Wadson Sebastião Duarte da Rocha, Carlos Eugênio Martins, Bruna de Paula Dias, Fausto Souza Sobrinho

#### **7. Avaliação de caracteres morfo-agronômicos de capim-elefante para uso energético**

Autores: Elizabeth Pereira dos Santos, João Romero Santos do Amaral de Carvalho Rocha, Jailton da Costa Carneiro, Marcelo Dias Muller, Francisco José da Silva Lédo, Juarez Campolina Machado

**8. Desenvolvimento de vetores lentivirais para geração de bovinos geneticamente modificados**

Autores: Thiago Serafim Fonseca, Fernanda da Silva Gonçalves, Carolina Capobiango Romano Quintão, Jasmin, Ivan Júnior Ascari, Ana Carolina Serafim Silva, Deividy Kellvy Barreto, Luiz Sérgio de Almeida Camargo.

**9. Screening de substratos ricos em saponina como agentes mitigadores de metano entérico em ruminantes**

Autores: Marcela Tavares Luiz, Larissa Gomes Reis, Ana Paula Sbardella, Fernanda Samarini Machado, Mariana Magalhães Campos, Thierry Ribeiro Tomich, Ademair Alves da Silva Filho, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira

**10. Produção de Embriões Clones bovinos por Hand Made Cloning em diferentes condições de maturação in vitro**

Autores: Deividy Kellvy Barreto, Luis Sérgio de Almeida Camargo, Carolina Capobiango R. Quintão, Thamiris Araujo Dornelas, Natana Chaves Rabelo, Eliza Diniz de Souza, Bruna de Souza Mesquita, Thiago Serafim Fonseca Lílian Tamy Iguma

**11. Caracterização de genes de produção e de doenças hereditárias em animais participantes do Programa Nacional de Melhoramento do Gir leiteiro.**

Autores: Amanda do Espírito Santo Fávero, Ingrid Novaes Pontes, Tamirys Silva Barino, Daniele Ribeiro de Lima Reis, Marco Antonio Machado

**12. PCR para o fator CAMP para identificação de Streptococcus agalactiae e Streptococcus uberis isolados de mastite**

Autores: Janaína Barros Miranda, João Batista Ribeiro, Marcos Aurélio Souto Silva, Carla Christine Lange; Bruna de Souza Mesquita, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito.

**13. Utilização de metodologias moleculares para a detecção de células viáveis Salmonella spp. em produtos lácteos**

Autores: Felipe de Oliveira Vieira; Juliana França Monteiro de Mendonça; Isabela Fonseca; Isabella Silvestre Barreto Pinto; Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos; Sula Abdallah Vieira Martins; Gisele Nogueira Fogaça; João Batista Ribeiro; Marta Fonseca Martins

**14. Características produtivas em capim-Xaraés (Brachiaria brizantha) sob duas alturas de resíduo e dois momentos de adubação**

Autores: Vinícius Sacramento Pacheco, Carlos Augusto de Miranda Gomide, Mirton José da Frota Morenz, Domingos Sávio Campos Paciullo, Fernando Teixeira Gomes, Clóvis Alencar Freitas Faria

**15. Composição bromatológica e cinética de fermentação ruminal in vitro de cinco forrageiras do Pantanal**

Autores: Sávio Augusto Toledo Moreira, Ellen de Almeida Moreira, Flávio Moreira de Almeida, José Augusto Gomes Azevêdo, Fernanda Samarini Machado, Thierry Ribeiro Tomich, Sandra Aparecida Santos, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira.

**16. Desenvolvimento e implementação de um sistema de backup para ambiente de computação científica com infraestrutura de baixo custo**

*Autores: Caio dos Santos Borsato de Carvalho, Kátia Santos, Marcos Vinícius Barbosa da Silva, Wagner Arbex*

**17. Avaliação da frequência de genes relacionados a doenças hereditárias e produção de leite em bovinos da Raça Girolando**

*Autores: Sula Abdallah Vieira Martins, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Gisele Nogueira Fogaça, Felipe de Oliveira Vieira, Juliana França Monteiro de Mendonça, Marta Fonseca Martins, Marcos Vinicius Barbosa da Silva*

**18. Separação e caracterização das principais proteínas do leite caprino e bovino pela eletroforese microfluídica e ureia-PAGE para a detecção de fraude do leite bovino adicionado ao caprino**

*Autores: Alessa Siqueira de O. dos Santos, Vaneida Maria Meurer, Gisele Nogueira Fogaça Felipe de Oliveira Vieira, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Sula Abdallah Vieira, Antônio Silvio do Egito, Marco Antônio Moreira Furtado, Marta Fonseca Martins*

**19. Detecção do caseinomacropeptídeo como indicador de fraude em leite bovino**

*Autores: Gisele Nogueira Fogaça, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos, Sula Abdallah Vieira Martins, Juliana França Monteiro de Mendonça, Felipe de Oliveira Vieira, Isabella Silvestre Barreto Pinto, Marta Fonseca Martins*

**20. Avaliação do Modelo de Glândula Mamária Extracorpórea para Estudos de Expressão Gênica**

*Autores: Isabella Silvestre Barreto Pinto, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos, Sula Abdallah Vieira Martins, Felipe de OliveiraVieira, Gisele Nogueira Fogaça, Juliana França Monteiro de Mendonça, Lyderson Facio Viccini, Marta Fonseca Martins*

**21. Detecção de patógenos viáveis pela técnica de PCR em Tempo Real**

*Autores: Juliana França Monteiro de Mendonça; Felipe de Oliveira Vieira; Sula Abdallah Vieira Martins; Gisele Nogueira Fogaça; Isabella Silvestre Barreto Pinto; Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos; João Batista Ribeiro; Marta Fonseca Martins*

**22. Produção de substâncias antagonistas por isolados ruminais**

*Autores: Romário Costa Fochat, Juliana Souto Ramos Sozzi, Júnior César Fernandes Lima, Marlice Teixeira Ribeiro, Jailton da Costa Carneiro, Aline Dias Paiva*

## Diversidade Molecular Estimada por Meio de Marcadores Microssatélites em Populações de *Lolium Multiflorum*

Fernando Rodrigues de Oliveira<sup>1</sup>, Raquel Morais de Paiva<sup>2</sup>, Andrea Mittelman<sup>3</sup>, Ana Luisa Sousa Azevedo<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Bolsista de Iniciação Científica da Embrapa Gado de Leite. Bolsista do CNPq. e-mail: [rodrigues-fernando1989@bol.com.br](mailto:rodrigues-fernando1989@bol.com.br)

<sup>2</sup> Mestranda do curso de Pós graduação em Genética da Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: [raquelpaiva@yahoo.com.br](mailto:raquelpaiva@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Pesquisadora Embrapa Gado de Leite. e-mail: [ana.azevedo@embrapa.br](mailto:ana.azevedo@embrapa.br); [andrea.mittelman@embrapa.br](mailto:andrea.mittelman@embrapa.br)

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** O Azevém anual (*Lolium multiflorum* Lam.) é uma das principais gramíneas de inverno, proveniente da Europa, largamente utilizada no Sul do Brasil. A intensificação na atividade pecuária exige forrageiras com melhor desempenho animal, resultando na demanda por variedades melhoradas, adaptadas aos diversos ecossistemas pastoris. A Embrapa Gado de Leite possui um programa de melhoramento de Azevém que além de utilizar as ferramentas clássicas do melhoramento vegetal, utiliza ferramentas moleculares para auxiliar na seleção de genótipos superiores. Marcadores moleculares são muito importantes, pois não são influenciados pelo ambiente e permitem estimar a diversidade genética e a frequência gênica populacional. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi estimar a variabilidade genética entre populações de azevém pertencentes ao programa de melhoramento da Embrapa Gado de Leite. O DNA de 628 indivíduos, pertencentes a 32 populações, foi extraído, e marcadores microssatélites obtidos através de amplificação cruzada foram utilizados. Um dendograma foi gerado pelo algoritmo UPGMA, usando-se o software NTSYS. Dentre os trinta e cinco pares de primers testados, vinte e cinco (71,5%) apresentaram amplificação cruzada em *L. multiflorum*, o uso de marcadores previamente descritos para espécies proximamente relacionadas demonstrou ser uma alternativa eficiente para a identificação de marcadores microssatélites em azevém. Quinze marcadores foram escolhidos com base no sucesso da amplificação cruzada e no polimorfismo apresentado. Os valores do coeficiente de similaridade obtidos variaram de 0,51 a 0,94. Uma alta divergência genética entre as populações foi observada, indicando um alto grau de diversidade. Este resultado era esperado, já que *L. multiflorum* é uma espécie alógama com uma ampla distribuição geográfica. Estes dados serão úteis, pois auxiliarão os melhoristas na condução de cruzamentos direcionados além de auxiliar no controle da diversidade genética existente após os vários ciclos de seleção.

**Palavras chaves:** azevém, microssatélites, SSR



# **Seleção de Híbridos Interespecíficos Hexaploides e genótipos de capim-elefante quanto à resistência à *Mahanarva spectabilis* (Hemiptera: Cercopidae)**

Antônio Marcos Oliveira Toledo<sup>1</sup>, Alexander Machado Auad<sup>2</sup>, Tiago Teixeira de Resende<sup>3</sup>, Marcy das Graças Fonseca<sup>4</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>2</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq. e-mail: antoniomarcosbio@live.com

<sup>2</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. e-mail: alexander.auad@embrapa.br

<sup>3</sup>Técnico da Embrapa Gado de Leite. e-mail: tiago.resende@embrapa.br

<sup>4</sup> Bolsista de pós-doutorado do CNPq. e-mail: [marcyfonseca@gmail.com](mailto:marcyfonseca@gmail.com)

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** O capim-elefante é uma importante forrageira no Brasil, no entanto seu cultivo é limitado pelo ataque de *Mahanarva spectabilis*. O objetivo do trabalho foi selecionar populações de híbridos interespecíficos hexaploides e genótipos de capim-elefante quanto à resistência a *M. spectabilis*; assim como avaliar o grau de manutenção da resistência quando os materiais foram novamente submetidos ao ataque do inseto praga. Inicialmente avaliou-se a resistência à *M. spectabilis* em 200 plantas da população PCEA e em 194 plantas da população PCM-0702 de capim-elefante. Em um segundo ensaio avaliou-se manutenção da resistência de 33 genótipos da população PCEA e 40 híbridos da PCM-0702. Após 30 dias do plantio, as plantas foram infestadas com seis ovos na fase próxima a eclosão, e o número de ninfas sobreviventes foi contabilizado após 40 dias. A sobrevivência ninfal de 30% dos genótipos da população PCEA foram próximas à testemunha resistente. Já 70% dos genótipos apresentaram sobrevivência ninfal próximas à testemunha suscetível. Resultados semelhantes foram encontrados na população PCM-0702, em que 36,2% dos híbridos apresentaram uma sobrevivência média ninfal próximas à testemunha resistente, e em 63,8% dos híbridos a sobrevivência ninfal foi próxima à testemunha suscetível. Dos materiais selecionados para o segundo ensaio, 9% e 12,5% da população PCEA e da população PCM-0702, respectivamente, mantiveram-se resistentes com sobrevivência ninfal inferior a 50%. Por outro lado, 91% e 87,5% dos materiais da população PCEA e da população PCM-0702, respectivamente, que foram resistentes no primeiro ensaio, apresentaram sobrevivência superior a 50%. Dos materiais avaliados, apenas os genótipos 34, 58 e 97 da população PCEA e os híbridos 31, 35, 41, 99 e 130 da população PCM-0702 foram selecionados por terem apresentado sobrevivência média de 37,49% no primeiro ensaio, e por terem mantidos o grau de resistência à *M. spectabilis* no segundo ensaio.

**Palavra-chave:** cigarrinha das pastagens, forrageira, grau de resistência, *Pennisetum purpureum*

## Composição morfológica, acúmulo de forragem e desempenho de novilhas em sistema silvipastoril

Clóvis de Alencar Freitas Faria<sup>2</sup>, Priscila Beligoli Fernandes<sup>3</sup>, Angelo Hebert Moreira Araújo<sup>4</sup>, Jorge Fellipe Rodrigues da Costa Santos<sup>5</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado da segunda autora, financiada pela Fapemig e Capes

<sup>2</sup>Acadêmico do curso de Ciências Biológicas – CES Juiz de Fora – MG. E-mail: [cacade Freitas@hotmail.com](mailto:cacade Freitas@hotmail.com)

<sup>3</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Zootecnia – UFRRJ - RJ Bolsista Capes.

<sup>4</sup> Acadêmico do curso de Zootecnia – IFET Rio Pomba.

<sup>5</sup> Acadêmico do curso de Zootecnia – UEG São Luiz dos Montes Belos – GO.

<sup>6</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. E-mail: [domingos.paciullo@embrapa.br](mailto:domingos.paciullo@embrapa.br)

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** O uso de sistemas silvipastoris tem sido sugerido como opção viável para a recuperação de pastagens degradadas e intensificação da produção animal em sistemas de produção leiteira. Contudo, o sombreamento imposto pelo componente arbóreo pode reduzir o crescimento vegetal e comprometer a capacidade de suporte do pasto. O trabalho teve como objetivo avaliar a composição morfológica, o acúmulo de forragem e o ganho de peso de novilhas leiteiras em pastagens de *B. decumbens* em monocultivo (MONO) ou em sistema silvipastoril (SSP), submetidas ao pastejo de lotação contínua, durante o verão e o outono. Foi usado o delineamento de blocos completos casualizados, com dois tratamentos e três repetições. O experimento foi realizado no Campo Experimental José Henrique Brusqui, pertencente à Embrapa Gado de Leite, no período de dezembro de 2013 a junho de 2014. As características do pasto foram estimadas por meio da coleta de 10 amostras obtidas a cada 21 dias, em cada piquete (1,5 ha). Para os pastejo, foram usadas três novilhas “testers” 1/2, 3/4 e 7/8 Holandês x Zebu, em cada repetição de área, totalizando nove novilhas por tratamento. Os animais foram pesados em intervalos de 30 dias, sempre depois de jejum de líquidos e sólidos por 12 horas. A taxa de acúmulo de forragem não variou com o sistema, apresentando valor médio de 66 kg/ha.dia. As massas secas de folha, colmo e material morto foram maiores no MONO que no SSP. Como reflexo das maiores massas de folhas, a taxa de lotação também foi maior no MONO (1,82 UA/ha) que no SSP (1,67 UA/ha), durante o verão. Apesar disso, não foi observada diferença significativa no ganho de peso individual das novilhas entre os dois sistemas de recria (média de 531 g/novilha.dia). As relações folha/colmo foram de 0,8 e 0,6 para o SSP e o MONO, respectivamente. A diferença de 25% a favor do SSP pode ter favorecido o consumo de forragem pelos animais e, possivelmente, neutralizado parcialmente a menor massa de forragem neste sistema.

**Palavras-chave:** *Brachiaria decumbens*, massa de folhas, taxa de lotação, ganho de peso, sombreamento

## **Avaliação de cultivares de capim-elefante e híbridos interespecíficos de capim-elefante e milho para uso forrageiro**

Michelli Andrade Tavares<sup>1</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>2</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>2</sup>, Ana Luisa Sousa Azevedo<sup>2</sup>, Antonio Vander Pereira<sup>2</sup>, Fausto de Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Alexander Machado Auad<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do curso de Ciências Biológicas do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora. Bolsista PIBIC CNPq. e-mail: [mixa\\_andrade@hotmail.com](mailto:mixa_andrade@hotmail.com)

<sup>2</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. e-mail: [ana.azevedo@embrapa.br](mailto:ana.azevedo@embrapa.br)

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** O objetivo do trabalho foi avaliar e selecionar cultivares de capim-elefante e híbridos interespecíficos de capim-elefante e milho para uso forrageiro. O ensaio foi realizado no Campo Experimental da Embrapa Gado de Leite localizado em Coronel Pacheco, MG. Utilizou-se delineamento de blocos casualizados com três repetições. Foram avaliadas três cultivares de capim-elefante (Pioneiro, Mineiro e BRS Canará) e três híbridos interespecíficos de capim-elefante e milho (Carajás; Paraíso e BRS Capileto). Realizou-se dois cortes de avaliação (corte 1: 27/02/14; corte 2: 02/05/14). As características avaliadas foram produção de matéria verde (PMV) e seca (PMS) de forragem; altura da planta (AP); vigor fenotípico (VF); porcentagem de matéria seca da forragem (%MS); e relação folha/colmo (RFC). Para PMV, PMS, %MS e RFC as cultivares apresentaram comportamento diferenciado nos dois cortes de avaliação realizados. As cultivares Pioneiro e BRS Canará apresentaram as maiores PMV no corte 1 (54.233 e 52.200 kg/ha, respectivamente) e no corte 2 foi a BRS Canará (45.333 kg/ha). A cv. Pioneiro obteve a maior PMS no corte 1 (17.736 kg/ha). No corte 2 as cultivares BRS Canará, Mineiro e Pioneiro constituíram o grupo com as maiores PMS (7.810, 7.670 e 7.555 kg/ha, respectivamente). Em todas as cultivares avaliadas verificou-se que a PMV e PMS obtidas no primeiro corte foram superiores a do segundo corte. Em ambos os cortes constatou-se que as cultivares Pioneiro, BRS Canará e Mineiro apresentaram as maiores alturas da planta (AP). As notas de vigor fenotípico (VF) das cultivares de capim-elefante foram superiores as das cultivares híbridas de capim-elefante e milho. As cultivares Pioneiro, BRS Canará e Mineiro destacaram-se das demais quanto a produção de matéria seca e verde de forragem, altura da planta e vigor fenotípico. As cultivares de capim-elefante apresentam maior produção de matéria verde e seca de forragem que as cultivares híbridas interespecíficas de capim-elefante e milho.

**Palavras-chave:** capineira, *Pennisetum purpureum*, *Pennisetum glaucum*

## **Avaliação de populações de *Brachiaria ruziziensis* em experimentos de VCU.**

Bruna de Paula Dias<sup>1</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>2</sup>, Fausto de Souza Sobrinho<sup>2</sup>, Thailany Laís de Oliveira<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Estudante do curso de Ciências Biológicas no Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora – CES/JF.

<sup>2</sup> Pesquisador Melhoramento de Forrageiras da Embrapa Gado de Leite.

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** O presente trabalho teve como objetivo avaliar populações de *Brachiaria ruziziensis* quanto ao rendimento de produção de forragem verde. A realização do ensaio de Valor de Cultivo e Uso (VCU) é necessário para lançamento de novos cultivares. No VCU de *Brachiaria* a avaliação deverá ser realizada em no mínimo 1 (um) local por bioma, num período mínimo de 2 (dois) anos, contemplando no mínimo cortes em dois períodos de maior precipitação e dois períodos de menor precipitação. O experimento está sendo conduzido no Campo Experimental de Santa Mônica (CESM) em Valença, RJ, pertencente a Embrapa Gado de Leite, representando o bioma Mata Atlântica. O delineamento adotado foi blocos casualizados, com três repetições, e com parcelas úteis de 8 m<sup>2</sup>, utilizando como testemunhas os cultivares Kennedy e Marandu. Nos três cortes avaliados 55% das populações tiveram comportamento semelhante ou superior o cultivar Kennedy, quanto à produtividade de forragem verde (t/ha) e 100% delas superaram o cultivar Marandu. No segundo corte houve ocorrência de forte calor e baixa precipitação no período da avaliação, o que é atípico para esse período do ano, e 100% das populações de *B. ruziziensis* superaram a média das testemunhas Kennedy e Marandu. Desta forma até o terceiro corte, as populações avaliadas de *B. ruziziensis*, apresentaram comportamento superior ou semelhante às cultivares Marandu e Kennedy.

**Palavras-chave:** forragem verde, produtividade, Zona da Mata

## Produtividade de forragem de clones melhorados de *B. ruziziensis* no inverno<sup>1</sup>

Thailany Lais de Oliveira<sup>2</sup>, Flávio Rodrigo Gandolfi Benites<sup>3</sup>, Wadson Sebastião Duarte da Rocha<sup>3</sup>, Carlos Eugênio Martins<sup>3</sup>, Bruna de Paula Dias<sup>2</sup>, Fausto Souza Sobrinho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq e Fapemig.

<sup>2</sup>Graduanda em Ciências Biológicas; CES/JF. e-mail: [thailanybr@hotmail.com](mailto:thailanybr@hotmail.com)

<sup>3</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite – R. Eugênio do Nascimento, 610 – CEP 3608-330 – Juiz de Fora/MG. e-mail: [fausto.souza@embrapa.br](mailto:fausto.souza@embrapa.br)

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** O cultivo de forrageiras no Brasil apresenta importante papel no cenário pecuário constituindo a principal fonte de alimento dos rebanhos brasileiros. A disponibilidade de forragem de qualidade durante todo o ano é de fundamental importância para possibilitar que os animais possam expressar todo o seu potencial produtivo. O objetivo desse trabalho foi avaliar a produtividade de forragem de clones melhorados de *B. ruziziensis* em condições de baixas temperaturas. Foram avaliados 35 clones de *Brachiaria ruziziensis* obtidos do programa de melhoramento genético, juntamente com as cultivares Basilisk (*B. decumbens*) e Marandu (*B. brizantha*) utilizadas como testemunhas. O corte foi realizado no final do mês de junho, com temperaturas noturnas inferiores à 18 °C. As plantas apresentavam 50 dias de idade. Os resultados das análises de variância mostraram diferenças significativas para a altura de plantas e para produtividade verde de forragem, evidenciando a existência de variabilidade genética entre os clones de *B. ruziziensis* avaliados. A média dos cinco melhores clones foi de 39,7 t de forragem verde por hectare, superando em quase 180% a média das duas cultivares utilizadas como testemunhas. Esses resultados evidenciam não só o grande potencial de produção de forragem da *B. ruziziensis*, mas também a possibilidade de selecionar clones que sejam mais produtivos nas condições do inverno, ou seja, que sejam menos influenciados pelas baixas temperaturas noturnas.

**Palavras-chave:** estacionalidade de produção, melhoramento genético de forrageiras, produção no inverno.

## **Avaliação de caracteres morfo-agronômicos de capim-elefante para uso energético**

Elizabeth Pereira dos Santos<sup>1</sup>, João Romero Santos do Amaral de Carvalho Rocha<sup>2</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>3</sup>, Marcelo Dias Muller<sup>3</sup>, Francisco José da Silva Léo<sup>3</sup>, Juarez Campolina Machado<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Gruaduada do curso de Biologia – CES/JF. Bolsista PIBIC. e-mail: [santos.beth@gmail.com](mailto:santos.beth@gmail.com)

<sup>2</sup>Mestrando do Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento – UFV. Bolsista CAPES. e-mail: [joaoascrocha@gmail.com](mailto:joaoascrocha@gmail.com)

<sup>3</sup>Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. e-mail: [juarez.machado@embrapa.br](mailto:juarez.machado@embrapa.br)

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** A avaliação da diversidade genética em relação ao uso energético no germoplasma de capim-elefante auxilia no pré-melhoramento e melhoramento dessa espécie, bem como possibilita a compreensão da variabilidade existente. Além do mais, o conhecimento da importância relativa das características faz-se necessário para que se possa elevar essa cultura a um patamar de destaque na diversificação sustentável da matriz energética brasileira. O experimento foi realizado no campo experimental da Embrapa Gado de Leite, localizado no município de Coronel Pacheco, MG. Foram avaliados 94 acessos do Banco Ativo de Germoplasma de Capim-Elefante da Embrapa (BAGCE) e seis testemunhas. Para análise da divergência genética foi utilizado o método de otimização de *Tocher* e a distância generalizada de *Mahalanobis*, como medida de dissimilaridade. A importância relativa dos caracteres, na predição da divergência genética foi estimada conforme o método proposto por Singh. Foi constatado que há variabilidade genética nas características morfo-agronômicas do capim-elefante para produção de biomassa energética. O método de otimização de *Tocher* permitiu o agrupamento dos acessos de capim-elefante em quatro grupos e 24 subgrupos. Há concordância dos grupos obtidos com a subdivisão da variabilidade dentro da espécie conforme o estabelecimento de tipo padrão. A importância relativa dos caracteres para a divergência genética, em ordem decrescente foi: produção de biomassa verde, porcentagem de biomassa seca, produção de biomassa seca, número de perfilhos, altura de plantas, diâmetro do colmo, acamamento e vigor fenotípico.

**Palavras-chave:** banco de germoplasma, biomassa energética, variabilidade

# **Desenvolvimento de vetores lentivirais para geração de bovinos geneticamente modificados**

## **Development of lentiviral vectors for the generation of genetically modified bovine**

Thiago Serafim Fonseca<sup>1,2</sup>, Fernanda da Silva Gonçalves<sup>3</sup>, Carolina Capobiango Romano Quintão<sup>3</sup>, Jasmin<sup>3</sup>, Ivan Júnior Ascari<sup>3</sup>, Ana Carolina Serafim Silva<sup>4</sup>, Deivid Kellvy Barreto<sup>1,2</sup>, Luiz Sérgio de Almeida Camargo<sup>3</sup>.

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** A utilização de vetores lentivirais proporciona um meio eficaz na transferência de genes exógenos para geração de animais transgênicos produtores de proteínas recombinantes. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver vetores lentivirais com transgene do fator IX de coagulação sanguínea humana para expressão desta proteína na glândula mamária de bovinos. Os vetores lentivirais foram produzidos em células HEK 293 FT cultivadas na concentração de  $1 \times 10^6$  em 10 placas de cultivo de 60 mm utilizando 3 mL de DMEM (SIGMA) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Gibco) a 37 °C em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, por transfecção transitória pela precipitação do DNA por solução de cloreto de cálcio, utilizando plasmídeos de empacotamento de 3ª geração e um plasmídeo recombinante contendo o gene repórter GFP. Foram construídos dois vetores contendo promotores específicos de glândula mamária, um contendo o promotor da  $\beta$ -caseína de cabra e o outro o promotor da  $\beta$ -caseína de bovinos responsáveis pela expressão do gene da biomolécula recombinante do fator IX coagulação sanguínea humana no leite. Para o estabelecimento da produção de partículas lentivirais foi realizada a co-transfecção de células HEK 293 FT utilizando plasmídeo recombinante (pLGW-GFP) para determinar a eficiência do método de transfecção. Foi estabelecido o protocolo de produção dos vetores lentivirais. As células após 48 h de transfecção com sistema lentiviral e o plasmídeo recombinante pLGW-GFP apresentaram 76,4% de expressão de GFP. A utilização dos lentivetores como ferramenta na geração de modelos animais biorreatores apresenta vantagens em relação à utilização das demais técnicas de transgenia. A construção de um multiplex de promotor de proteínas do leite/gene da proteína recombinante de interesse poderá ser uma alternativa atraente para melhorar a expressão de biofármacos na glândula mamária destes animais.

**Palavras-chave:** animais transgênicos, proteínas recombinantes, fator IX de coagulação sanguínea humana, vetor lentiviral, transgenia

**Abstract:** The use of lentiviral vectors provides an efficient means to transfer foreign genes to generate transgenic animals producing recombinant proteins. The aim of this study was to develop lentiviral vectors with transgene of human factor IX blood clotting for expression of this protein in the mammary gland of cattle. The lentiviral vectors were produced in HEK 293 FT cells cultured at a concentration of  $1 \times 10^6$  in 10 culture plates using 60mm using 3 mL of DMEM (Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (Gibco) at 37 in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> by transient transfection by precipitation of DNA by the calcium chloride solution using packaging plasmids 3rd generation and a recombinant plasmid containing the GFP reporter gene. Two vectors were constructed containing specific promoters mammary gland, containing the promoter of the  $\beta$ -casein from goat and the other promoter of the  $\beta$ -casein from bovine responsible for the expression of recombinant biomolecule human factor IX blood clotting in milk gene. For the establishment of producing lentiviral particles co-transfection of HEK 293 FT cells using recombinant plasmid (pLGW-GFP) to determine the efficiency of transfection method was performed. The protocol for the production of lentiviral vectors has been established. Cells 48h after transfection with the recombinant lentiviral system and pLGW-GFP plasmid showed 76.4% of GFP expression. The use of lentivetores as a tool in generating animal models of bioreactors have advantages over the use of other techniques for transgenesis.

The construction of a multiplex milk protein promoter/gene of the recombinant protein of interest may be an attractive alternative to improve biopharmaceutical expression in mammary gland of these animals.

**Keywords:** transgenic animals, recombinant proteins, human factor IX blood clotting, lentiviral vector, transgenic

**Support:** CNPq



# **Screening de substratos ricos em saponina como agentes mitigadores de metano entérico em ruminantes<sup>1</sup>**

Marcela Tavares Luiz<sup>2</sup>, Larissa Gomes Reis<sup>3</sup>, Ana Paula Sbardella<sup>4</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>5</sup>, Mariana Magalhães Campos<sup>5</sup>, Thierry Ribeiro Tomich<sup>5</sup>, Ademar Alves da Silva Filho<sup>6\*</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Projeto PECUS-RumenGases (Embrapa/CNPq/Fapemig)

<sup>2</sup>Graduanda na Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. E-mail: [marcelatavaresf@hotmail.com](mailto:marcelatavaresf@hotmail.com)

<sup>3</sup>Farmacêutica e bolsista do CNPq ATP-A. e-mail: [larissagomesreis@yahoo.com.br](mailto:larissagomesreis@yahoo.com.br)

<sup>4</sup>Mestranda pela Universidade Estadual Paulista. e-mail: [paulasbardella@gmail.com](mailto:paulasbardella@gmail.com)

<sup>5</sup>Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. e-mail: [fernanda.machado@embrapa.br](mailto:fernanda.machado@embrapa.br), [mariana.campos@embrapa.br](mailto:mariana.campos@embrapa.br), [thierry.tomich@embrapa.br](mailto:thierry.tomich@embrapa.br), [luiz.gustavo@embrapa.br](mailto:luiz.gustavo@embrapa.br)

<sup>6</sup>Professor Doutor do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora. e-mail: [ademar.alves@ufjf.edu.br](mailto:ademar.alves@ufjf.edu.br)

\*Bolsista de produtividade em pesquisa do CNPq

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** Extratos de plantas com alta concentração de compostos secundários vêm sendo avaliados quanto ao potencial de mitigação de metano entérico. Dentre estes compostos, destacam-se as saponinas que têm ação na supressão dos protozoários ruminais. No presente estudo foram avaliados os efeitos da inclusão (0, 0,2, 0,4 e 0,8 g/L) de oito extratos hidroalcóolicos de plantas ricas em saponina (*Hydrocotyle asiatica*, *Smilax officinalis*, *Solanum lycocarpum*, *Pffafia glomerata*, *Polygonum cf. hidropiperoides* Mich, *Solanum paniculatum*, *Aesculus hippocastanum* e *Dioscorea cayenensis*) na produção de metano pela técnica *in vitro* de produção de gases. Foi utilizado como substrato padrão o feno de *Brachiaria brizantha*, cv Marandu. Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado em esquema fatorial 8 x 4 (extratos x níveis de inclusão) com três repetições (inóculos). As médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% e submetidas a análise de regressão. A inclusão de *Polygonum cf. hidropiperoides*, *Solanum lycocarpum* e *Pffafia glomerata* ao feno de braquiário aumentou ( $p > 0,05$ ) a produção de metano por grama de matéria seca digestível incubada. A adição de *Solanum paniculatum* promoveu a redução ( $p < 0,05$ ) na produção total de gases e de metano por grama de matéria seca incubada e digerida. Os demais extratos avaliados não promoveram alterações significativas na produção de gases ou de metano. Os valores de pH e digestibilidade *in vitro* da matéria seca não foram influenciados pela adição dos extratos avaliados. O extrato hidroalcóolico da espécie *Solanum paniculatum* apresenta potencial para a mitigação de metano entérico, sendo necessários estudos *in vivo* para comprovação da atividade anti-metanogênica nos animais.

**Palavras-chave:** compostos secundários, extrato de planta, fermentação ruminal, metanogênese, ruminantes, saponina

# **Produção de Embriões Clones bovinos por Hand Made Clonning em diferentes condições de maturação *in vitro***

## **Production of Embryo Clones cattle by Hand Made Clonning in different conditions of maturation in vitro**

Deividy Kellvy Barreto<sup>1</sup>, Luis Sérgio de Almeida Camargo<sup>2</sup>, Carolina Capobiango R. Quintão<sup>3</sup>, Thamiris Araujo Dornelas<sup>4</sup>, Natana Chaves Rabelo<sup>4</sup>, Eliza Diniz de Souza<sup>5</sup>, Bruna de Souza Mesquita<sup>1</sup>, Thiago Seraphim Fonseca<sup>1</sup> Lillian Tamy Iguma<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Graduando em Biomedicina, Bolsista Iniciação Científica PIBIC. UNIPAC-JF Juiz de Fora MG, Brasil

<sup>2</sup>Pesquisador Embrapa Gado de Leite - Juiz de Fora MG, Brasil

<sup>3</sup>Analista Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora MG, Brasil

<sup>4</sup>Mestranda Universidade Federal Juiz de Fora, MG, Brasil

<sup>5</sup>Doutoranda Universidade Federal do Espírito Santo/RENORBIO Vitoria, ES, Brasil

Agradecimento: ao CNPq

**Resumo:** A transferência nuclear (clonagem animal) é uma técnica capaz de permitir a preservação de espécimes raros, podendo também constituir em uma alternativa na produção de embriões e indivíduos transgênicos, produtores de proteínas recombinantes de interesse humano. Para a produção desses embriões clones *in vitro*, os oócitos doadores de citoplasma tiveram em comum a maturação *in vitro* (MIV) em meio TCM 199 (Invitrogen, California, USA), suplementado com hormônios, antibióticos e piruvato por 20 h. A MIV se diferenciou no sistema de maturação sendo o alternativo, proposto por este trabalho com 0,1% álcool polivinílico (PVA), 5% CO<sub>2</sub> e 5% O<sub>2</sub> (G1), e o convencional com MIV contendo 10% soro fetal bovino (SFB), 5% CO<sub>2</sub> e 20% O<sub>2</sub> (G2). No sistema proposto (G1) a tensão de oxigênio é mais similar aquela encontrada *in vivo*. Foram produzidos ainda dois outros grupos de embriões, através de ativação partenogenética que foram utilizados como controle do experimento: G3- partenogenéticos, submetidos às mesmas condições de maturação de G1 e G4- partenogenéticos, submetidos às mesmas condições de maturação de G2. Por análise em teste t os valores de P < 0,05 foram considerados significativos e apresentados como média ± erro padrão da média (EPM). Foi observado que o meio MIV não interferiu nas taxas de enucleação e reconstrução dos grupos de clonagem (G1 e G2), mostrando que as duas condições de MIV estudadas dos oócitos não interferem nestes parâmetros. A clivagem entre todos os grupos foi analisada por ANOVA (análise de variância) seguido pelo teste de *Student Newman-Keuls*. Segundo este teste, não houve diferença entre G1 e G2, mas G2 foi maior que G4. G3 apresentou menor taxa que G1 e G4. Por análise em teste t foi avaliada a taxa de embrião no D7 e D8 separadamente para cada sistema de MIV. No sistema convencional, não houve diferença estatística entre G2 e G4 (P>0,05). Os grupos G1 e G3 não resultaram em número de embriões suficiente para que fosse realizada análise estatística.

**Palavras-chave:** ativação partenogenética, clonagem, maturação *in vitro*, transgenia, *hand made clonning*

**Abstract:** The nuclear transfer (cloning of animals) is a technique capable of allowing the preservation of rare specimens, and may also provide an alternative for the production of embryos and transgenic individuals, producers of recombinant proteins of human interest. For the production of these embryo clones in vitro, the oocytes donors of cytoplasm had in common the maturation in vitro (IVM) in TCM 199 (Invitrogen, California, USA), supplemented with hormones, antibiotics and pyruvate for 20 h, THE IVM differed in the system of maturation being the alternative, Proposed by this work with 0.1% polyvinyl alcohol (PVA), 5% CO<sub>2</sub> and 5% O<sub>2</sub> (G1), and the conventional with IVM containing 10% fetal bovine serum (FBS), 5% CO<sub>2</sub> and 20% O<sub>2</sub> (G2). In the proposed system (G1) the oxygen tension is more like that found in vivo. Were produced two further groups of embryos through activation partenogenetica that were used as a control of the experiment: G3- partenogeneticos, subjected to the same conditions of maturation of G1

and G4- partenogeneticos, subjected to the same conditions of maturation of G2. For analysis of t-test P values < 0.05 were considered significant and are presented as mean standard error of the mean (SEM). It was observed that the IVM did not interfere in the rates of enucleation and reconstruction of groups of cloning (G1 and G2), showing that the two conditions of IVM studied of oocytes do not interfere with these parameters. The cleavage between all groups were analyzed by ANOVA (analysis of variance) followed by Student Newman-Keuls. According to this test, there was no difference between G1 and G2, but G2 was higher than G4. G3 showed a lower rate than G1 and G4. By analysing t test was evaluated the rate of embryo in D7 and D8 separately for each system of IVM. In the conventional system, there was no statistical difference between G2 and G4 ( $P > 0.05$ ). The groups G1 and G3 do not result in number of embryos enough for it to be performed statistical analysis.

**Keywords:** parthenogenetic activation, cloning, in vitro maturation, transgenics, hand made clonning

## Introdução

A transferência nuclear (TN), proposta por Speemann (1938) é hoje uma técnica apresentada como uma alternativa para produzir animais transgênicos a partir da utilização de linhagens celulares que receberam DNA exógeno específicos (BEHBOODI et al., 2002), tornando-se uma alternativa viável para a produção de animais transgênicos produtores de proteínas recombinantes. Em 1997, Schnieke et al., produziram com sucesso o primeiro clone transgênico com um gene humano, a ovelha Polly, produzida com fibroblastos fetais transfectados com o fator IX da coagulação humana. Outra aplicação da TN é seu uso na conservação e na regeneração dos recursos genéticos e espécies em extinção (PEREIRA, 2010). Neste caso, a técnica também pode ser chamada de clonagem animal.

Na TN, o núcleo de uma célula doadora é inserido no citoplasma de um oócito receptor cujo genoma foi removido. Peura et al. (1998) utilizaram oócitos sem zona pelúcida (ZP) para produzir embriões e animais saudáveis e viáveis por TN sem uso de micromanipulador. Posteriormente, estudos aprimoraram a técnica descrita por Peura et al. (1998) utilizando células somáticas para produção de embriões sem ZP, técnica esta que ficou consolidada como *Hand Made Clonning* (HMC) (VAJTA et al., 2000, 2001, 2003). A clonagem por TN pela técnica de HMC associada ao sistema de cultivo *Well-Of-The-Well* (WOW) (VAJTA et al., 2000, 2001, 2003) é uma alternativa eficiente em relação à clonagem convencional (com o uso de micromanipuladores) (RODRIGUES et al., 2008) e também uma alternativa para a produção de animais transgênicos através da introdução do transgene nos carioplastos (células doadoras de núcleo).

Na clonagem, a reprogramação do carioplasto fica a cargo do ambiente citoplasmático do oócito receptor (RUMPF & IGUMA, 2004). Essa reprogramação deve ocorrer de forma cronológica e sincronizada, pois os genes corretos precisam se expressar no momento exato para que haja o desenvolvimento normal e apropriado. Sendo assim, o ambiente em que o oócito é maturado antes de receber o novo material genético é de suma importância, podendo interferir em etapas iniciais e tardias como embriogênese, gestação e nascimento (IGUMA, 2005b). O sistema convencional de maturação *in vitro* (MIV) de oócitos bovinos utiliza o meio base TCM 199 (Invitrogen, California, USA) suplementado com hormônios, antibióticos, soro bovino fetal (SBF) em uma atmosfera gasosa de 5% de dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), 20% de oxigênio ( $\text{O}_2$ ), em umidade saturada. (BAVISTER, 1995). Algumas alternativas à este sistema são a substituição do SBF por macromoléculas sintéticas inertes como o álcool polivinílico (PVA) (VIREQUE et al., 2009) e a modificação da tensão de  $\text{O}_2$  para mais próximo do fisiológico (1,5 A 8,5% (BANWELL et al., 2007). A alta tensão de  $\text{O}_2$  (20%) aumenta a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) que pode levar ao estresse oxidativo e apoptose, prejudicando o desenvolvimento embrionário (UEDA et al., 2002). Hashimoto et al. (2000) e Yuan et al., (2003) observaram que a baixa tensão de  $\text{O}_2$  na MIV e no cultivo *in vitro* (CIV) pode melhorar a produção *in vitro* de embriões (PIV). Pereira et al. (2011) demonstraram que o sistema de MIV com 5% de  $\text{O}_2$  e PVA em substituição ao soro de vaca em cio (SVC) foi

mais vantajoso em relação à qualidade dos embriões quando comparado aos cultivos convencionais.

A formação de um embrião, a partir do gameta feminino, sem a presença do gameta masculino, com ou sem desenvolvimento de um indivíduo, é definida como partenogênese (FUKUI et al., 1992). Oócitos ativados partenogeneticamente são, muitas vezes, empregados em experimentos de clonagem como controles das condições de manipulação, tais como temperatura ambiente, meio de manutenção, metodologia e sistema de ativação, sistema de cultivo e qualidade intrínseca dos oócitos (SHEN et al., 2007; WANG et al., 2008).

Levando-se em conta que o panorama atual da TN ainda conta com uma baixa taxa de nascimentos e descendentes saudáveis (LOI et al., 2006) e há a necessidade de pesquisas com enfoque na melhoria dessas taxas, o presente ensaio buscou estabelecer um protocolo eficaz para a produção de embriões clones via TN por HMC, através de modificações na suplementação do meio de maturação e na atmosfera gasosa de oócitos usados como doadores de citoplasma.

## Materiais e Métodos

Fibroblastos bovinos, em 3ª e 4ª passagem, foram obtidos de um animal produzido por transferência nuclear, a partir de uma célula transfectada com o gene repórter *green fluorescent protein (GFP)*. No entanto, até o presente momento, ainda não tinham sido realizadas análises para comprovar se o animal era de fato transgênico. Os fibroblastos foram descongelados e cultivados em meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) enriquecido com 10% de SFB e 0,1% de antibiótico, mantidas em estufa incubadora a 38,5 °C, com 5% CO<sub>2</sub> em ar atmosférico e 95% de umidade, até atingirem o estágio de confluência total (e permanecendo nesse estágio durante três dias aproximadamente) para serem então utilizadas no estado de senescência. Estas células são pertencentes a um banco de células já estabelecidas no Laboratório de Reprodução Animal (LRA) da Embrapa Gado de Leite – Juiz de Fora, MG – Brasil.

Ovários obtidos em abatedouro local foram aspirados para recuperação dos complexos cumulus-oócitos (CCO's). Os oócitos de melhor qualidade (graus 1 e 2) foram selecionados e maturados segundo os seguintes tratamentos: G1 (n=14) – oócitos maturados em meio acrescido de 0,1% PVA e atmosfera gasosa de 5% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>; G2 (n=23) – oócitos maturados em meio acrescido de 10% SFB e atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> e 20% O<sub>2</sub>; G3 (n=54) – oócitos maturados nas mesmas condições de G1, utilizados para ativação partenogenética; G4 (n=51) – oócitos maturados nas mesmas condições de G2, utilizados para ativação partenogenética. Foram realizadas 4 repetições. Todos os grupos permaneceram na MIV por 19 a 20 horas, utilizando-se, além das condições citadas acima, o meio TCM 199 (Invitrogen, California, USA) suplementado com FSH, LH, piruvato, antibiótico a 38,5 °C e alta umidade. Após a MIV, os CCO's foram desnudados em solução de hialuronidase (Sigma Aldrich) a 0,1% em vórtex. Após o desnudamento, os oócitos doadores de citoplasma para TN (G1 e G2) permaneceram imersos em solução de demecolcina 10 µg/mL (Sigma Aldrich), por 2 h, para extrusão química do cone mitótico, de modo que facilitasse a localização do material genético. Após esse período, a zona pelúcida (ZP) foi removida em solução de pronase 2 mg/mL (Sigma Aldrich) por três minutos, procedendo-se a secção manual, com auxílio de uma microlâmina, para a retirada de aproximadamente 30% do citoplasma do oócito contendo o material genético. O intuito era obter metades de citoplasma sem material genético do oócito.

Em seguida, os fibroblastos foram preparados. Estes constituem-se nos doadores de núcleo.

Cada fibroblasto foi lavado em solução de fitohemaglutinina 1 mg/mL (Sigma Aldrich) e colocado em contato com dois hemi-citoplasmas formando um "sanduíche". Após a formação deste complexo, o mesmo foi fusionado usando um pulso elétrico DC de 2,1 KVA/cm em solução de manitol 0,3 M, através de um eletrofusor (Votain™ EP-1) conjunto de embriões que resistiram à fusão foi cultivado por 2-3 horas em meio CR2aa e as estruturas que se apresentaram fusionadas foram ativadas com ionomicina (2 µM) por 4 minutos seguidas de 4 horas em 6-DMAP (2 mM).

Ao mesmo tempo, os oócitos destinados à ativação partenogenética (G3 e G4) foram ativados partenogeneticamente nas mesmas condições.

Zigotos recém-construídos por TN e embriões partenogenéticos (controle) foram cultivados em placas de sistema WOW (VAJTA et al., 2000) contendo meio CR2aa com 2,5% SFB e cobertas com óleo mineral (Sigma Aldrich), em 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub> a 38,5 °C e umidade saturada.

Os resultados de clivagem entre todos os grupos foram analisados por ANOVA (análise de variância) seguido pelo teste de *Student Newman-Keuls* (SNK). Os resultados comparativos de taxas de enucleação, reconstrução e D7 e D8 foram comparadas pelo teste t. Os valores de  $P < 0,05$  foram considerados significativos e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

## Resultados e Discussão

Não houve diferença estatística na taxa de enucleação entre G1 e G2 ( $32,58 \pm 5,19$  e  $34,38 \pm 2,53$ , respectivamente). Estes dados mostram que as modificações implementadas na atmosfera gasosa e na suplementação do meio MIV não interferiram na qualidade da exposição do cone mitótico após tratamento com demecolcina para enucleação.

A eficiência da taxa de reconstrução nos tratamentos G1 e G2 também não apresentou diferença estatística ( $7,145 \pm 3,00$  e  $11,5 \pm 4,5$ , respectivamente). Estes dados mostram que os diferentes sistemas de MIV não interferiram na qualidade dos hemicitoplasmas disponibilizados para TN.

Foi avaliada a taxa de clivagem em todos os grupos. Onde G1 foi similar a G2 ( $100\% \pm 0$  e  $91,41 \pm 4,819$ , respectivamente), G2 apresentou maior taxa de clivagem em relação a G4 ( $50,14 \pm 20,35$ ) e G3 ( $11,12 \pm 5,55$ ) apresentou menor taxa de clivagem em relação a G1 e G4. Estes dados mostram que a clivagem entre os tratamentos HMC não apresentou diferença, mas a clivagem dos grupos controle (partenogenéticos) submetidos à diferentes tratamentos sim. A baixa taxa de clivagem dos embriões partenogenéticos (G3 e G4) pode ser atribuída ao tempo esperado para sua manipulação, já que eles só eram manipulados após terminados os tratamentos. O tempo excessivo em estufa, no meio de maturação, pode ter contribuído para a degeneração das estruturas.

Com relação à taxa de embriões em D7 e D8, foram comparados apenas tratamentos do mesmo sistema de maturação. O sistema convencional não apresentou diferenças, tanto em D7 ( $G2=8,587 \pm 4,819$  e  $G4=27,23 \pm 21,91$ ), como em D8 ( $G2=8,587 \pm 4,819$  e  $G4=27,23 \pm 21,91$ ). Podemos concluir que o sistema de clonagem por TN-HMC se mostrou igualmente eficiente ao controle partenogenético em relação à taxa de produção de embriões.

Não foi possível comparar a taxa de embriões em D7 e D8 para o tratamento de MIV no sistema alternativo proposto de 5% O<sub>2</sub> (G1 e G3), pois não haviam repetições suficientes para realizar a análise estatística. Devido às dificuldades encontradas, tanto na enucleação quanto na reconstrução, como no tempo gasto para a execução da técnica, muitas estruturas rompiam ou degradavam durante a manipulação, tornando-se inviáveis.

## Conclusão

Apesar das dificuldades encontradas durante a realização do experimento, foi possível estabelecer um protocolo para a produção de embriões clones bovinos através da técnica de *Hand Made Cloning*, no Laboratório de Reprodução Animal.

Porém, há a necessidade de se ter mais pessoas capacitadas a trabalhar com a técnica, de modo a reduzir o tempo das manipulações e aumentar sua eficiência.

## Agradecimentos

Embrapa Gado de Leite Juiz de Fora – MG, Brasil, pelo desenvolvimento do Experimento, à Fapemig e ao CNPQ/PIBIC pelo apoio financeiro.

## Literatura Citada

BANWELL, K.M., LANE, M., RUSSELL, D.L., KIND, K.L., THOMPSON, J.G. Oxygen concentration during mouse oocyte in vitro maturation affects embryo and fetal development. **Human Reproduction**, v.22, n.10, p.2768-2775, 2007.

BAVISTER, B.D. Culture of preimplantation embryos: facts and artifacts. **Human Reproduction Update**, v.1, n.2, p. 91-148. 1995

BEHBOODI, E.; CHEN, L.; DESTREMPES, M.M.; MEADE, H.M.; ECHELARD, Y. Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins. In: CIBELLI, J.; LANZA, R.P.; CAMPBELL, K.H.S.; WEST, M.D. (Ed.). **Principles of cloning**. New York: Academic Press, 2002. p.459-472.

FUKUI, Y. et al. Parthenogenetic Development of Bovine Oocytes Treated with Ethanol and Cytochalasin B after In Vitro Maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v.33, p.357–362, nov.1992.

HASHIMOTO, S., MINAMI, N., TAKAKURA, R., YAMADA, M., IMAL, H., KASHIMA, N. Low oxygen tension during in Vitro maturation is beneficial for supporting the subsequent development of bovine cumulus-oocyte complex. **Molecular Reproduction Nutrition and Development**, v.57, p.353-361, 2000.

IGUMA, L.T., **Clonagem Bovina por Transferência Nuclear de Células Somáticas: Efeitos da Transfecção de Células Doadoras de Núcleos e do FSH em Ovócitos Receptores**. Tese (Doutorado) Biologia Molecular. Brasília, DF: Universidade de Brasília, 2005b.215 f.

LOI, P., CLINTON, M., VACKOVA, I., FULKA, JR, J., FEIL, R., PALMIERI, C., SALDA, L.D., PTAK, G. Placental abnormalities associated with post-natal mortality in sheep somatic cell clones. **Theriogenology**, v.65, p.1110-1121, 2006.

PEREIRA, A.F., **Transferência nuclear de células somáticas (TNCS) em ruminantes: aspectos moleculares e produção de embriões**. Tese (Doutorado) Ciências Veterinárias. Fortaleza, CE: Universidade Estadual do Ceará, 2010, 148p.

PEREIRA, M.M., MACHADO, M.A., COSTA, F.Q., SERAPIÃO, RV., VIANA, J.H.M., CAMARGO, L.S.A. Effect of oxygen tension and serum during in vitro maturation on developmental competence of bovines oocytes. **Reproduction Fertility and Development**, v.22, p.1074-1082. 2011.

PUERA, T.T., LEWIS, I.M., TROUNSON, A.O., The effect of recipient oocyte volume on nuclear transfer in cattle. **Molecular Reproduction and Development**, v.50, p.185-191, 1998.

RODRIGUEZ, L., NAVARRETE, F.I., TOVAR, H., COV, J.F., CASTRO, F.O., High developmental potential in vitro and in vivo of cattle embryos cloned without micromanipulators. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v.25, n.1, p.13-16, 2008.

RUMPF, R., IGUMA, L.T., **Clonagem animal: aplicações, estado da arte e desafios**. In: Márcia Rogéria de Almeida; Aluizio Borém; Glória Regina Franco. (Org.). **Biotecnologia e saúde**. Viçosa, MG: Editora Folha de Viçosa Ltda, 2004, p. 155-188.

SCHNIEKE, AE., KIND, A.J., RITCHIE, WA., MYCOCK, K., SCOTT, A.R., RITCHIE, M., WILMUT, I., COLMAN, A., CANPBELL, K.H. Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclear from transfected fetal fibroblast. **Science**, v.278, p.2130-2133, 1997.

SHEN, P.C. et al. The Effect of Activation Treatments on the Development of Reconstructed Bovine Oocytes. **Animal Reproduction Science**. v.106, n.1-2, p.1-12, mar. 2007.

SPEEMANN H. Embryonic development and induction. New Haven, CT: **Yale University Press**, 1938.

UEDA, S., MASUTANI, H., NAKAMURA, H., TANAKA, T., UENO, M., YODO, J. Redox control of cell death. **Antioxidants and Redox Signaling**, v.4, n.3, p.405-414. 2002.

VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; HYTTTEL, P.; THOUAS, G.A.; TROUNSON, A.O. Somatic cell cloning without micromanipulators. **Cloning**, 3, 89-91, 2001.

VAJTA, G.; LEWIS, I.M.; TROUNSON, A.O.; PURUO, S.; MADDOX-HYTTEL, P.; SSCHMINDT, M.; PEDERSEN, H.G.; GREVE, T.; CALLESEN, H. Handmade somatic cell cloning in cattle: analysis of factors contributing to high efficiency *in vitro*. **Biology of Reproduction**, 68, 571-578, 2003.

VAJTA, G.; PEURA, T.T.; HOLM, P.; PÁLDI, A.; GREVE, T.; TROUNSON, A.O.; CALLESEN, H. New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system. **Molecular Reproduction and Development**, 55, 256-264, 2000.

VIREQUE, A.A., CAMARGO, L.S., SERAPIÃO, R.V., ROSA, S.A.A., WATANABE, Y.F., FERREIRA, E.M., NAVARRO, P.A., MARTINS, W.P., FERRIANI, R.A. Preimplantation development and expression of Hsp-70 and Bax genes in bovine blastocysts derived from oocytes matured in alpha-MEN supplemented with growth factors and synthetic macromolecules. **Theriogenology**, v.71, p.620-627, 2009.

WANG, Z.G. et al. Effects of Different Activation Protocols on Preimplantation Development Apoptosis and Ploidy of Bovine Parthenogenetic Embryos. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.105, n.3-4, p.292-301, may 2008.

YUAN, Y.Q., VAN SOON, A., COOPMAN, F.O., MINTIENS, K., BOERJAN, M.L., VAN ZEVEREN, A., DE KRUIF, A., PEELLMAN, L.J. Influence of oxygen tension on apoptosis and hatching in bovine embryos cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v.59, p.1585-1596, 2003.

# **Caracterização de genes de produção e de doenças hereditárias em animais participantes do Programa Nacional de Melhoramento do Gir leiteiro.**

Amanda do Espírito Santo Fávero<sup>1</sup>, Ingrid Novaes Pontes<sup>2</sup>, Tamirys Silva Barino<sup>3</sup>, Daniele Ribeiro de Lima Reis<sup>4</sup>, Marco Antonio Machado<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduanda em Ciências Biológicas CES-JF/Bolsista PIBIC do CNPq, mandinhafavero09@hotmail.com

<sup>2</sup>Graduanda em Biomedicina UNIPAC-JF, ingridnovaes\_didi@hotmail.com

<sup>3</sup>Graduanda em Ciências Biológicas UFJF, tamirysbarino@hotmail.com

<sup>4</sup>Analista na Embrapa Gado de Leite, danielle.reis@embrapa.br

<sup>5</sup>Pesquisador na Embrapa Gado de Leite, marco.machado@embrapa.br

Agradecimento: ao CNPq

**Resumo:** O Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (PNMGL) tem proporcionado uma fantástica evolução na eficiência produtiva da raça Gir, impactando grandemente no aumento da produção de leite no País e tornando o Brasil exportador de genética bovina para países de clima tropical. Com a comercialização de sêmen, faz-se necessário a realização de testes para caracterizar os genes de produção de leite (Bet lactobulina e Kappa-caseína) e genes de doenças hereditárias, como o complexo de má formação vertebral (CVM), a deficiência leucocitária bovina (BLAD) e a deficiência de uridina monofosfato sintetase (DUMPS). O DNA dos animais foi extraído a partir de amostras de sangue, sêmen ou pelo, utilizando protocolos adaptados. A quantificação do DNA foi feita em espectrofotômetro. A genotipagem de CVM foi feita pela técnica AS-PCR (*Allele Specific-Polymerase Chain Reaction*). As outras genotipagens foram realizadas utilizando a técnica de PCR seguida de digestão por enzima de restrição, conhecida como PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). Os resultados foram observados pela análise dos fragmentos obtidos após a eletroforese em gel de poli acrilamida nativo a 8%. Para Bet lactobulina e Kappa-caseína foram genotipados 131 touros Gir. Um total de 23 animais apresentaram os alelos AA, 69 AB e 39 BB para Bet lactobulina e 101 animais apresentaram os alelos AA, 30 AB e nenhum BB para Kappa-caseína. Para o diagnóstico de CVM, BLAD e DUMPS, 58 touros Gir foram testados, sendo que nenhum animal apresentou o alelo mutante para essas doenças. Essas informações foram inseridas no sumário anual de touros Gir, edição 2014. Com as genotipagens para determinação dos alelos relacionados às proteínas Beta-lactobulina e Kappa-caseína o produtor poderá selecionar animais que possuem os alelos B, que estão ligados ao maior rendimento de queijo. Em relação às doenças hereditárias, como o sêmen dos touros participantes do PNMGL são distribuídos para todo o Brasil, é recomendável que exista um controle sanitário para estas doenças, evitando sua disseminação.

**Palavras-chave:** genes de produção, doenças hereditárias, programa de melhoramento, zebuínos leiteiros

**Apoio Financeiro:** Embrapa, Fapemig e CNPq



## PCR para o fator CAMP para identificação de *Streptococcus agalactiae* e *Streptococcus uberis* isolados de mastite

Janaína Barros Miranda<sup>1</sup>, João Batista Ribeiro<sup>2</sup>, Marcos Aurélio Souto Silva<sup>3</sup>, Carla Christine Lange<sup>2</sup>; Bruna de Souza Mesquita<sup>2</sup>, Maria Aparecida Vasconcelos Paiva Brito<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Graduanda em Biomedicina, Faculdade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup> Pesquisador, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup> Assistente de Pesquisa, Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Agradecimento: ao CNPq

**Resumo:** Na rotina do diagnóstico microbiológico da mastite bovina as bactérias isoladas das amostras de leite são identificadas por meio de um conjunto simplificado de testes fenotípicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido empregada isoladamente ou em adição aos testes fenotípicos para a identificação de espécies de relevância, conferindo maior agilidade e confiabilidade ao diagnóstico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a contribuição da amplificação do gene do fator CAMP por meio de PCR, na identificação de *S. agalactiae* e *S. uberis* isolados de mastite bovina. Foram utilizados testes fenotípicos (hidrólise do hipurato de sódio, da esculina e da inulina, crescimento em meio de bile esculina, teste de Pirrolidonil-arilamidase (PYR), produção do fator CAMP) e amplificação dos genes do fator CAMP de *S. uberis* (*cfu*) e de *S. agalactiae* (*cfb*) para identificar 47 amostras de *Streptococcus* spp., depositadas na Coleção de Microrganismos de Interesse da Agroindústria e Pecuária da Embrapa Gado de Leite. Os resultados dos testes fenotípicos permitiram identificar 29 amostras como *S. uberis* e 15 como *S. agalactiae*; três amostras não puderam ser identificadas com os testes empregados. Houve 100% de concordância entre o teste fenotípico para detecção do fator CAMP em *S. uberis* e a amplificação do gene *cfu*, enquanto para *S. agalactiae*, foi de 86,6% (13 no total de 15 amostras) para o gene *cfb*. As duas amostras de *S. agalactiae* que não apresentaram produto de amplificação para o gene *cfb*, foram identificadas por meio da amplificação do gene 16S rRNA. Os testes de hidrólise do hipurato, da esculina e da inulina foram definitivos para identificar *S. uberis* CAMP negativos. *S. agalactiae* foram identificados corretamente pelos testes de CAMP, hidrólise do hipurato, ausência de hidrólise da esculina e de crescimento em meio de bile-esculina. Possivelmente alguma variação no gene *cfb* impediu a sua amplificação com o par *primers* empregados nas duas amostras de *S. agalactiae*.

**Palavras-chave:** gene *cfb*, gene *cfu*, identificação bacteriana, testes fenotípicos.

## Utilização de metodologias moleculares para a detecção de células viáveis *Salmonella* spp. em produtos lácteos

Felipe de Oliveira Vieira<sup>1</sup>; Juliana França Monteiro de Mendonça<sup>3</sup>; Isabela Fonseca<sup>2</sup>; Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>3</sup>; Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>3</sup>; Sula Abdallah Vieira Martins<sup>1</sup>; Gisele Nogueira Fogaça<sup>1</sup>; João Batista Ribeiro<sup>4</sup>; Marta Fonseca Martins<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG  
felipe\_vieira89@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>4</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Resumo:** A cadeia produtiva do leite é uma das mais importantes do agronegócio brasileiro, sendo o país o quarto maior produtor mundial. Um problema ainda encontrado é relativo à qualidade e segurança do alimento. Produtos lácteos muitas vezes são veículos de micro-organismos patogênicos, sendo a *Salmonella* spp. um patógeno encontrado com bastante frequência nestes produtos. Este trabalho tem como objetivo estabelecer um protocolo para detecção de células viáveis de *Salmonella* spp. baseado em metodologias moleculares, por meio da PCR em Tempo Real (qPCR) utilizando o intercalante de DNA Brometo de Etídio Monoazida (EMA). Para padronizar a qPCR foram crescidas duas culturas de *Salmonella*, uma foi submetida a tratamento térmico para inviabilizar as células, e a outra não sofreu tratamento térmico. Estas culturas foram, posteriormente, tratadas com o corante EMA para intercalação ao DNA e assim detectar somente células viáveis. Os resultados médios de Cycle Threshold (Ct) apresentaram em média uma diferença de 12 ciclos de amplificação entre as amostras viáveis e inviáveis tratadas com EMA, demonstrando que o protocolo desenvolvido é capaz de detectar apenas células viáveis de *Salmonella* em culturas puras. Além disso, observou-se que amostras viáveis tratadas com EMA apresentaram valores de Ct maiores do que as amostras viáveis não tratadas. Isso pode ocorrer pelo fato de estar sendo usada uma concentração alta do corante, fazendo que o mesmo interaja com o DNA de algumas células viáveis. Assim, faz-se necessária a realização de novos testes para se determinar a concentração mínima do intercalante que irá interagir somente com as células de cultura pura com membrana ou parede celular danificada. Depois de estabelecida esta concentração, os testes serão realizados em produtos de mercado.

**Palavras-chave:** EMA, metodologias moleculares, qPCR, micro-organismos patogênicos, segurança do alimento

## **Características produtivas em capim-Xaraés (*Brachiaria brizantha*) sob duas alturas de resíduo e dois momentos de adubação<sup>1</sup>**

Vinícius Sacramento Pacheco<sup>2</sup>, Carlos Augusto de Miranda Gomide<sup>3</sup>, Mirton José da Frota Morenz<sup>3</sup>, Domingos Sávio Campos Paciullo<sup>3</sup>, Fernando Teixeira Gomes<sup>4</sup>, Clóvis Alencar Freitas Faria<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Parte da monografia do primeira autor, E-mail: [sacramentopacheco@hotmail.com](mailto:sacramentopacheco@hotmail.com)

<sup>2</sup>Bolsista PIBIC/CNPq da Embrapa Gado de Leite.

<sup>3</sup> Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite. E-mail: [carlos.gomide@embrapa.br](mailto:carlos.gomide@embrapa.br); [mirton.morenz@embrapa.br](mailto:mirton.morenz@embrapa.br); [domigos.paciullo@embrapa.br](mailto:domigos.paciullo@embrapa.br)

<sup>4</sup>Professor do Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora-CESJF. E-mail: [ftgomes2002@yahoo.com.br](mailto:ftgomes2002@yahoo.com.br)

Agradecimento: ao CNPq

**Resumo:** Existe uma relação direta entre o aumento da massa de forragem e a aplicação da fonte nitrogenada. Contudo, se faz necessário estabelecer qual o momento mais adequado para aplicação deste nutriente, a fim de se obter a máxima eficiência na utilização do N. Sendo assim, avaliaram-se as respostas das características produtivas da *Brachiaria brizantha*, cv. Xaraés, sob duas alturas de resíduo (15 e 25 cm) e em dois momentos distintos de adubação (após o corte-PC; e após a expansão da 1ª folha-EPF), sendo estudadas as variáveis: altura do dossel forrageiro (AD); massa seca total (MT); proporções de folhas (PF), colmos (PC) e material morto (PMM); e relação folha:colmo (F:C). O delineamento utilizado foi o de blocos ao acaso, em esquema fatorial 2 x 2. Empregou-se a formulação 20-05-20, em dosagem de 150 kg/ha/ano. Os cortes foram realizados rente ao solo, quando as plantas atingiram 95% da interceptação luminosa. Após a coleta, as amostras foram pesadas, separadas e secas em estufa, para determinação da matéria seca. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste "F" (P>0,05). A AD foi influenciada pela altura de resíduo e pelo critério de adubação, sendo observada a maior média para o resíduo de 25 cm (71,6 cm) e para a o critério EPF (72,7 cm). A variável MT foi influenciada pela altura de resíduo, apresentando a maior produção no resíduo de 25 cm (3125 kg/ha). A PF e PMM foram influenciadas apenas pela altura de resíduo, que apresentou a maior PF (50,70%) no resíduo de 15 cm e a maior PMM para o resíduo de 25 cm (29,25%). A F:C foi influenciada pelo resíduo, apresentando o maior valor (2,05) para a altura de 15 cm. Os resultados indicam que as características estruturais da forragem ofertada foram mais adequadas no resíduo de 15 cm. Quanto ao momento de adubação, por não exercer influência sobre a maioria das variáveis estudadas, acredita-se que a aplicação do N possa ser realizada logo após a coleta da forragem.

**Palavras-chave:** nitrogênio, corte, massa seca total; altura de dossel; relação F:C

## Composição bromatológica e cinética de fermentação ruminal *in vitro* de cinco forrageiras do Pantanal<sup>1</sup>

Sávio Augusto Toledo Moreira<sup>2</sup>, Ellen de Almeida Moreira<sup>3</sup>, Flávio Moreira de Almeida<sup>4</sup>, José Augusto Gomes Azevêdo<sup>5</sup>, Fernanda Samarini Machado<sup>6</sup>, Thierry Ribeiro Tomich<sup>6</sup>, Sandra Aparecida Santos<sup>7</sup>, Luiz Gustavo Ribeiro Pereira<sup>6\*</sup>.

<sup>1</sup> Parte do Projeto RumenGases (financiado pelo CNPq, Embrapa e Fapemig)

<sup>2</sup> Graduando, Universidade Presidente Antônio Carlos, Juiz de Fora – MG. E-mail: savioaugusto2005@hotmail.com

<sup>3</sup> Mestranda, Universidade Estadual de Santa Cruz, Ilhéus - BA.

<sup>4</sup> Doutorando, Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga – BA

<sup>5</sup> Professor da Universidade Estadual de Santa Cruz, Bolsista de Produtividade do CNPq, Ilhéus – BA

<sup>6</sup> Pesquisadores da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora – MG

<sup>7</sup> Pesquisadora da Embrapa Pantanal, Corumbá – MS

\* Bolsista de Produtividade do CNPq, Juiz de Fora - MG

Agradecimento: ao CNPq

**Resumo:** Atualmente, o Pantanal apresenta o melhor estado de conservação ambiental entre todos os ecossistemas brasileiros. Este fato está diretamente relacionado à forma de produção da pecuária local, com a utilização das pastagens nativas. As informações sobre o valor nutritivo das forrageiras nativas do Pantanal ainda são escassas. Neste trabalho objetivou-se avaliar a composição química, o valor energético e a cinética de fermentação ruminal *in vitro* de cinco forrageiras nativas do Pantanal (*Axonopus purpusii*, *Panicum laxum*, *Reimarochloa* sp, *Mesosetum chaseae*, e *Andropogon hypogynus*). Os parâmetros de composição avaliados foram matéria seca (MS), proteína bruta (PB), fibra detergente neutro (FDN), fibra detergente ácido (FDA) e nutrientes digestíveis totais (NDT). A cinética de fermentação ruminal foi avaliada pela técnica *in vitro* semi-automática de produção de gases. O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado com três repetições. Os dados de cinética de fermentação ruminal *in vitro* foram ajustados a um modelo estatístico bicompartimental, determinando-se as produções de gases para as frações de carboidratos fibrosos - CF e carboidratos não fibrosos - CNF. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). A gramínea *A. hypogynus* (capim-vermelho) apresentou os menores valores ( $p < 0,05$ ) de PB e NDT e os maiores ( $p < 0,05$ ) de FDN e FDA. Na avaliação da cinética de fermentação ruminal *in vitro* o *A. hypogynus* apresentou os menores valores ( $p < 0,05$ ) de taxa e extensão da fermentação (para as frações CF e CNF). O *A. purpusii* (capim-mimoso) apresentou os maiores valores ( $p < 0,05$ ) de volume final de gases para a fração de CF. Os resultados de composição química, teor energético e cinética de fermentação ruminal indicam o valor nutritivo inferior para o *A. hypogynus* frente às demais forrageiras avaliadas.

**Palavras-chave:** forrageiras nativas, produção de gases, valor nutritivo.

# **Desenvolvimento e implementação de um sistema de *backup* para ambiente de computação científica com infraestrutura de baixo custo**

Caio dos Santos Borsato de Carvalho<sup>1</sup>, Kátia Santos<sup>2</sup>, Marcos Vinícius Barbosa da Silva<sup>2</sup>, Wagner Arbex<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF

<sup>2</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa

Agradecimento: ao CNPq

**Resumo:** Como nos dias atuais a geração de dados está cada vez mais crescente, tornou-se necessário a criação de modelos computacionais para estabelecer procedimentos metodológicos para análise de dados. Desta forma é imprescindível a criação e implementação de métodos e estruturas para que dados possam ser armazenados e tratados com a eficácia necessária. Assim, nosso objetivo principal foi criar um sistema de *backup* automático e seguro. Criando um sistema de discos unificado com o Network File System (NFS) e o Multi Hard Disk Distributed File System (MHDDFS) e com dispositivos de armazenamento externo conectados à rede, tínhamos duas áreas para copiar dados de um *array* de discos (*storage*) através de um servidor. Após isso criamos *scripts* para executar o *backup* automaticamente para estas áreas. Com os *scripts* criados com comandos para localização (*find*) e cópia (*rsync*) de diretórios, acesso remoto (*ssh* e *sshpas*) às máquinas para armazenamento, e agendamento de execução deste *scripts* no servidor (*cron*), conseguimos obter um sistema de *backup* automático com chances mínimas de erros ou falhas e que é de extrema importância para a segurança de certos dados. Notamos também que está cada vez mais comum dados serem gerados em grande escala. Assim computadores com hardwares mais avançados são necessários para atender a demanda. Porém, com computadores de menor desempenho é possível criar centros de processamento (*clusters*) com o desempenho necessário tornando mais viável a implementação de certos métodos e sistemas. É importante ressaltar, também, que com equipamentos capazes de realizar tarefas voltadas para o armazenamento de dados e tratamento dos mesmo e com procedimentos definidos para estes propósitos, conseguimos criar um ambiente que proporciona segurança, eficiência de armazenamento e processamento e outras características que são de extrema relevância para usuários comuns até grandes centros empresariais.

**Palavras-chave:** armazenamento, backup, cluster, computação, dados, metodologia

# **Avaliação da frequência de genes relacionados a doenças hereditárias e produção de leite em bovinos da Raça Girolando**

Sula Abdallah Vieira Martins<sup>1</sup>, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>2</sup>, Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>2</sup>, Gisele Nogueira Fogaza<sup>1</sup>, Felipe de Oliveira Vieira<sup>1</sup>, Juliana França Monteiro de Mendonça<sup>2</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>3</sup>, Marcos Vinicius Barbosa da Silva<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG. E-mail: sula@cabanguinternet.com.br

<sup>2</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora/MG.

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora/MG.

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** Genotipar os animais de produção para doenças hereditárias e genes de produção é importante não só pela mortalidade mas, também, pela possibilidade de disseminação de alelos indesejáveis nas diferentes raças. Desse modo o objetivo do presente estudo foi identificar os touros do teste de progênie (TP) da raça Girolando que sejam portadores de alelos de anomalias hereditárias, tais como BLAD, DUMPS e CVM, e ainda, avaliar os genes KCN, LGB, DGAT1 e OPN relacionados à produção de leite. BLAD é uma doença que resulta em uma disfunção do sistema imunológico e se manifesta quando os animais são homozigotos para o alelo mutante, desenvolvendo a doença e morrendo ainda novos. Animais com uma cópia do alelo afetado (portadores) são normais, mas o transmitem. DUMPS é caracterizada pela morte prematura do embrião, ocorre em embriões homozigotos para o alelo, onde estes morrem por volta do 40º dia e animais heterozigotos possuem um fenótipo normal. CVM é uma síndrome letal que causa o retardamento do crescimento, má-formação vertebral e deformações no septo ventricular, com modo de herança semelhante as duas doenças acima relatadas. Para os genes relacionados à produção de leite, o alelo B de KCN está associado a um maior rendimento para produção de queijo, o alelo A de LGB está associado ao aumento da produção de leite; o alelo K de DGAT1 está associado a um aumento da porcentagem de gordura e o alelo C de OPN que está associado a um aumento de teor de proteína e gordura. Os 15 grupos de touros do TP foram genotipados por PCR-RFLP. A frequência dos animais portadores para BLAD foi de 0,004, para DUMPS não foi identificado nenhum portador e para CVM a frequência encontrada foi de 0,015. Para os genes de produção, a frequência encontrada para KCN foi 0,88 para o alelo A e 0,12 para o alelo B; para LGB foi 0,56 para o alelo A e 0,44 para o B; para DGAT1 encontramos 0,44 para o alelo A e 0,56 para o K; para OPN o resultado foi 0,29 para o alelo C e 0,71 para o T. Com posse desses resultados os produtores podem planejar os acasalamentos evitando assim que os alelos indesejados para as doenças hereditárias possam ser transmitidos para as próximas gerações e também aumentando a frequência dos alelos favoráveis para os genes de produção.

**Palavras-chave:** marcadores moleculares, bovinos leiteiros, PCR

# **Separação e caracterização das principais proteínas do leite caprino e bovino pela eletroforese microfluídica e ureia-PAGE para a detecção de fraude do leite bovino adicionado ao caprino**

Alessa Siqueira de O. dos Santos<sup>1\*</sup>, Vaneida Maria Meurer<sup>1</sup>, Gisele Nogueira Fogaça<sup>2</sup>, Felipe de Oliveira Vieira<sup>2</sup>, Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>1</sup>, Sula Abdallah Vieira<sup>2</sup>, Antônio Silvio do Egito<sup>4</sup>, Marco Antônio Moreira Furtado<sup>1</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

<sup>2</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora-MG

<sup>4</sup>Embrapa Caprinos e Ovinos, Sobral-CE

\*Bolsista de Pós-Doutorado CAPES. e-mail: alessa.siqueira@gmail.com

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** A separação e a caracterização das principais proteínas do leite caprino, bovino e suas misturas representam uma alternativa de detecção de fraude comumente praticada em países que utilizam leite de cabra para consumo por pessoas com problemas alérgicos ou de intolerância e, principalmente, para a produção de derivados de alto valor agregado. Este tipo de adulteração representa perdas econômicas para empresas que processam leite de cabra e ainda geram problemas de saúde pública. Este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil eletroforético de amostras de leite de cabra, de vaca e de suas misturas pela técnica de eletroforese microfluídica e comparar ao método de eletroforese em gel de poliacrilamida em condições redutoras com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) e na presença de ureia (ureia-PAGE). Foram realizadas as misturas de adição de leite bovino em leite caprino nas proporções de 2, 4, 6, 8, 10, 12, 15, 20, 35, 50%. Os métodos avaliados revelaram que o perfil eletroforético da  $\alpha_{s1}$ -CN bovina foi diferente da  $\alpha_{s1}$ -CN caprina. Dessa forma, a proteína  $\alpha_{s1}$ -CN bovina foi utilizada como marcador para a detecção dessa fraude. Foi possível detectar adição de leite bovino cru no leite caprino cru pela avaliação do perfil da  $\alpha_{s1}$ -CN bovina pela técnica de eletroforese microfluídica a partir de adição de 20% (v/v) e pelo método de ureia-PAGE a partir de 2% (v/v) da mistura. O método, eletroforese capilar microfluídica, apresentou rapidez e automatização na determinação do perfil eletroforético das principais das caseínas do leite bovino e caprino. A técnica evidenciou a proteína caseína  $\alpha_{s1}$  bovina como marcador de detecção de adulteração do leite caprino com leite bovino. A técnica é baseada na eletroforese das proteínas em condição redutora com SDS, no entanto, a eletroforese microfluídica na presença de ureia pode ser uma alternativa para melhorar sua sensibilidade já que a separação das caseínas pelo ureia-PAGE mostrou-se mais sensível na detecção da fraude.

**Palavras-chave:** adulteração, eletroforese microfluídica, leite, poliacrilamida, proteínas

## **Detecção do caseinomacropeptídeo como indicador de fraude em leite bovino**

Gisele Nogueira Fogaça<sup>1</sup>, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>2</sup>, Sula Abdallah Vieira Martins<sup>1</sup>, Juliana França Monteiro de Mendonça<sup>2</sup>, Felipe de Oliveira Vieira<sup>1</sup>, Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>2</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, CES/JF, Juiz de Fora, MG

<sup>2</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** O leite bovino contém grande valor nutricional e é muito consumido pela população mundial, mas frequentemente é alvo de adulterações sendo uma das mais comuns a chamada fraude econômica, caracterizada pela adição de soro de queijo ao leite. Para evitar esta fraude o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, em 2006, estabeleceu um método oficial para detecção. Esse método é baseado na técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), metodologia muito laboriosa. O princípio norteador da técnica é a quantificação e determinação de caseinomacropeptídeo (CMP) em amostras de leite. O CMP é um macropeptídeo oriundo da quebra da kappa-caseína do leite por ação da enzima quimosina ou renina durante a fabricação de queijos; está presente somente no soro doce e por isso é um forte indicativo de fraude econômica e sua identificação tem sido o foco de muitos trabalhos. Metodologias alternativas foram desenvolvidas em outros estudos, como eletroforese em SDS-PAGE, a qual resultou em dados satisfatórios. Assim, este trabalho teve como objetivo a detecção de CMP por meio de um método novo ainda não utilizado para identificá-lo, a eletroforese microfluídica, e comparar os resultados com a eletroforese em SDS-PAGE para futuras aplicações como metodologia alternativa a oficial. Foram utilizadas amostras de leite cru de vaca com adição de soro de queijo nos níveis: 0 (leite puro); 1; 2,5; 5; 10; 20; 40 e 100% (soro puro) tratadas com ácido tricloroacético (TCA) para extração do CMP; e amostra desse mesmo leite puro (sem o tratamento com TCA) para traçar o perfil proteico do leite. Os resultados obtidos foram satisfatórios para o método empregado, pois um pico com aproximadamente 30 kDa foi detectado nas amostras com adição de soro a partir de 2,5%, não aparecendo no controle negativo (0%) e nem na amostra de leite cru puro. Este valor de massa molecular é incomum para as proteínas do leite já descritas com uso da eletroforese microfluídica em chip, o que se pode dizer que este pico provavelmente trata-se do CMP; porém, o pico encontrado não apresentou linearidade à medida que os níveis de adição de soro aumentaram. O método de eletroforese em SDS-PAGE se mostrou mais sensível para a detecção de CMP apresentando banda com aproximadamente 20 kDa para as mesmas amostras testadas. Tanto a corrida eletroforética em chip quanto a realizada em SDS-PAGE, podem ter sido influenciadas pelo método de extração do CMP das amostras de leite cru fraudadas com soro de queijo, já que é uma metodologia minuciosa e controlada manualmente. Portanto é importante aprimorar e padronizar o método de extração do CMP para as posteriores análises eletroforéticas.

**Palavras-chave:** Adulteração, caseinomacropeptídeo, eletroforese microfluídica, SDS-PAGE, soro de queijo



# Avaliação do Modelo de Glândula Mamária Extracorpórea para Estudos de Expressão Gênica<sup>1</sup>

Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>2</sup>, Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>3</sup>, Sula Abdallah Vieira Martins<sup>4</sup>, Felipe de Oliveira Vieira<sup>4</sup>, Gisele Nogueira Fogaça<sup>4</sup>, Juliana França Monteiro de Mendonça<sup>5</sup>, Lyderson Facio Viccini<sup>6</sup>, Marta Fonseca Martins<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Parte da tese de doutorado da primeira autora, financiada pela CNPq

<sup>2</sup>Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Imunologia e DIP/Genética e Biotecnologia - UFJF/Juiz de Fora. Bolsista da CAPES. e-mail: [isabellasp@gmail.com](mailto:isabellasp@gmail.com)

<sup>3</sup>Bolsista de Pós Doutorado PNPd/Capes. e-mail: [alessa.siqueira@gmail.com](mailto:alessa.siqueira@gmail.com)

<sup>4</sup>Alunos de graduação em Ciências Biológicas - CES/JF. e-mail: [sula@cabanguinternet.com.br](mailto:sula@cabanguinternet.com.br), [felipe\\_vieira89@yahoo.com.br](mailto:felipe_vieira89@yahoo.com.br), [gisele\\_fogaca@hotmail.com](mailto:gisele_fogaca@hotmail.com)

<sup>5</sup>Mestranda do Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia do Leite e Derivado - UFJF/Juiz de Fora. Bolsista da CAPES. e-mail: [julianafmm@yahoo.com.br](mailto:julianafmm@yahoo.com.br)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF/Juiz de Fora. e-mail: [lyderson.viccini@ufjf.edu.br](mailto:lyderson.viccini@ufjf.edu.br)

<sup>7</sup>Embrapa Gado de Leite. e-mail: [marta.martins@embrapa.br](mailto:marta.martins@embrapa.br)

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** A experimentação animal é muito debatida e sua realização é cada vez mais fiscalizada pelos órgãos competentes. Uma alternativa ao uso de animais em experimentos é a utilização de modelos *ex-situ*, como o modelo de glândula mamária extracorpórea, já validado e utilizado em testes com fármacos e cosméticos. Com base nisso, o objetivo do trabalho foi validar o modelo de glândula mamária extracorpórea para estudos de expressão gênica. Para isso, foram coletadas seis glândulas mamárias, provenientes de animais abatidos destinados ao descarte. As glândulas foram levadas para o Laboratório de Nanotecnologia/Embrapa onde foram divididas em dois grupos: perfundidas e não perfundidas. Para realização dos testes genéticos foram coletadas 120 amostras de tecido alveolar e 120 amostras de canal do teto ao longo do tempo de experimentação: 0, 1, 3, 4 e 6 h. Também foram coletadas amostras do perfusato para realização de testes bioquímicos e verificação da viabilidade da glândula durante o tempo de perfusão. A validação do modelo para estudos genéticos foi realizada com cinco genes constitutivos e sua expressão quantificada por meio de PCR Tempo Real. Os resultados dos testes bioquímicos indicaram que as glândulas perfundidas se mantiveram viáveis ao longo do tempo de experimentação. Os resultados de PCR em Tempo Real indicaram diferença de expressão para os genes GAPDH, 18S rRNA e Ubiquitina para as amostras de canal do teto entre as glândulas perfundidas e não perfundidas, indicando uma possível alteração fisiológica na glândula não perfundida. Isto não ocorreu para as amostras de tecido alveolar, o que pode indicar que a glândula não perfundida ainda se manteve viável durante as seis horas de perfusão. Com base nos resultados obtidos pode-se dizer que o modelo de glândula mamária extracorpórea mostrou-se viável para estudos genéticos, indicando a viabilidade do modelo para novos estudos genéticos e abrindo as portas para a validação de novos métodos de experimentação animal.

**Palavras-chave:** bovinos, modelo *ex-situ*, genes, úbere

# Detecção de patógenos viáveis pela técnica de PCR em Tempo Real

Juliana França Monteiro de Mendonça<sup>1</sup>; Felipe de Oliveira Vieira<sup>2</sup>; Sula Abdallah Vieira Martins<sup>2</sup>; Gisele Nogueira Fogaça<sup>2</sup>; Isabella Silvestre Barreto Pinto<sup>3</sup>; Alessa Siqueira de Oliveira dos Santos<sup>4</sup>; João Batista Ribeiro<sup>5</sup>; Marta Fonseca Martins<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG. e-mail: [julianafmm@yahoo.com.br](mailto:julianafmm@yahoo.com.br)

<sup>2</sup>Centro de Ensino Superior de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>3</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>4</sup>Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG

<sup>5</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Agradecimento:** ao CNPq

**Resumo:** Apesar do Brasil ser um grande produtor de leite, há vários aspectos relacionados à segurança de alimentos que ainda precisam ser resolvidos e que constituem um entrave para que o País possa se afirmar no mercado mundial de lácteos. Muitos surtos de intoxicações alimentares transmitidas pelo leite e derivados têm sido relatados, sendo o *Staphylococcus aureus* o patógeno mais comumente associado a intoxicação alimentar estafilocócica. Existem algumas técnicas descritas para a detecção de *S. aureus* em alimentos, desde técnicas de microbiologia clássica até modernas técnicas moleculares. As técnicas clássicas, porém, são laboriosas e demoradas, enquanto as moleculares não diferenciam células viáveis e inviáveis, o que é imprescindível na análise de alimentos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi estabelecer um protocolo para detecção de células viáveis de *S. aureus* por PCR em Tempo Real utilizando o intercalante de DNA Brometo de Etídio Monoazida (EMA). A extração do DNA para a realização da PCR foi realizada a partir de culturas viáveis ou inativadas pelo calor, tratadas ou não com o intercalante. Os resultados médios de *CycleThreshold* (Ct) apresentaram diferenças de 15,2 ciclos de amplificação entre as amostras viáveis e inviáveis tratadas com EMA, demonstrando que o protocolo desenvolvido é capaz de detectar apenas células viáveis de *S. aureus* em culturas puras. Além disso, observou-se que amostras viáveis tratadas com EMA apresentaram valores de Ct maiores do que as amostras viáveis não tratadas. Tal efeito pode ser explicado pela alta concentração de EMA utilizada nas reações (50 µg/mL), ou seja, concentrações menores do intercalante de DNA podem não afetar a amplificação das células vivas, mas ainda sim impedir a amplificação das inviáveis. Sendo assim, torna-se necessária a realização de novos testes a fim de se determinar a concentração ideal do EMA para uso tanto em culturas puras quanto em reações com matriz alimentar, uma vez que a mesma pode interferir na reação de ligação do EMA ao DNA de células com membranas danificadas.

**Palavras-chave:** Intercalantes de DNA, diagnósticos moleculares, segurança de alimentos.

## Produção de substâncias antagonistas por isolados ruminais

Romário Costa Fochat<sup>1</sup>, Juliana Souto Ramos Sozzi<sup>2</sup>, Júnior César Fernandes Lima<sup>3</sup>, Marlice Teixeira Ribeiro<sup>3</sup>, Jailton da Costa Carneiro<sup>4</sup>, Aline Dias Paiva<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Graduando do curso de Farmácia - UFJF/Juiz de Fora. Bolsista da Embrapa Gado de Leite. e-mail: romariofochat@gmail.com

<sup>2</sup>Graduanda do curso de Farmácia - Suprema/Juiz de Fora. Bolsista da Embrapa Gado de Leite. e-mail: juliana.soutoramos@gmail.com

<sup>3</sup>Laboratório de Microbiologia do Rúmen – Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora. Analistas da Embrapa Gado de Leite. e-mail: junior.lima@embrapa.br e marlice.ribeiro@embrapa.br

<sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia do Rúmen – Embrapa Gado de Leite/Juiz de Fora. Pesquisador da Embrapa Gado de Leite. e-mail: jailton.carneiro@embrapa.br

<sup>5</sup>Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia - ICB - UFJF/Juiz de Fora. Professora adjunta 1. e-mail: alinedpaiva@yahoo.com.br

Agradecimento: ao CNPq

**Resumo:** Peptídeos antimicrobianos têm se destacado como uma possível alternativa ao uso de antibióticos na medicina humana e animal. Os peptídeos antimicrobianos produzidos por bactérias são denominados bacteriocinas e aqueles não caracterizados completamente são referidos como substâncias inibitórias tipo bacteriocina. Neste trabalho foi avaliada a produção de substâncias antagonistas por isolados Gram-positivos provenientes de líquido ruminal bovino e pertencentes ao Laboratório de Microbiologia do Rúmen, da Embrapa Gado de Leite. Inicialmente, a atividade antagonista dos isolados selecionados foi avaliada pelo método de sobrecamada, utilizando *Streptococcus macedonicus*, *S. equinus* e *Streptococcus* sp. como indicadores da atividade antibacteriana; a presença de halos de inibição (>6 mm de diâmetro) do crescimento do micro-organismo indicador em torno das colônias dos isolados selecionados indicou antagonismo. Para excluir a ação de interferentes sobre a atividade antagonista observada nos testes de sobrecamada foi avaliada a presença de bacteriófagos, a produção de ácidos e a ação do clorofórmio. Foram avaliados 29 isolados, sendo que 20,7% (n=6) destes apresentaram atividade antagonista contra pelo menos uma das bactérias indicadoras. Os isolados C6I8, C6I9, AS1.5 e ISO37 (13,8% dos isolados analisados) inibiram o crescimento das três indicadoras avaliadas. O micro-organismo *S. macedonicus* foi o que apresentou maior sensibilidade, podendo ser utilizado como um bom indicador da atividade antagonista. Nos testes de exclusão de interferentes não foi observada presença de bacteriófagos e também não houve influência do pH ou do clorofórmio sobre a atividade antagonista observada. Os resultados obtidos demonstraram que os isolados ruminais produziram substâncias antagonistas. Trabalhos adicionais são necessários para confirmar a natureza proteica de tais substâncias, bem como proceder à extração e caracterização dessas moléculas antimicrobianas.

**Palavras-chave:** bacteriocinas, rúmen bovino, *Streptococcus*